

**Untersuchungen zur Bedeutung der
S-Transnitrosylierungs-Reaktion für die Bildung, den
Metabolismus und die Vermittlung der biologischen
Aktivitäten von NO und S-Nitroso-Substanzen**

vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

**genehmigte
Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Jörg Sandmann

geboren am 28.01.1971 in Hannover

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Jürgen C. Frölich

Tag der Promotion: 25.04.2000

Datum der Veröffentlichung: Mai 2000

Die vorliegende Arbeit entstand von März 1997 bis Februar 2000 in Zusammenarbeit des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Direktor Prof. Dr. med. Jürgen C. Frölich mit dem Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper, bei denen ich mich für die gebotenen Arbeitsbedingungen und ihre Betreuung bedanken möchte. Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen C. Frölich für die Übernahme des Korreferats und die von ihm gewährte finanzielle Unterstützung am Ende meiner experimentellen Arbeiten danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Dimitrios Tsikas, der diese Arbeit mit seiner kritischen, kreativen und hilfsbereiten Art umfassend und kontinuierlich betreute.

Bei Frank-M. Gutzki möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft und für die Durchführung der GC-MS-Analysen bedanken.

Für die Messungen am Aggregometer danke ich Kathrin S. Tewes. Für die Durchführung der Voruntersuchungen zur Entwicklung der analytischen Methode zur Bestimmung von GSNO mittels HPLC mit Fluoreszenz- und UV-Absorptions-Detektion nach Vor-Säulen-Derivatisierung mit OPA danke ich David Holzberg und Periklis Pantazis. Für die Durchführung der ESI-MS-Analysen danke ich Dr. Manfred Raida vom niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF), Hannover. Ich danke ebenfalls Athanasia Savva und Piet Lueßen für die Durchführung der Versuche an den Ratten.

Für die Spende isolierter neuronaler NO-Synthase danke ich Prof. Dr. Bernd Mayer vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Karl-Franzens-Universität Graz.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Klinische Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums in jeglicher Form unterstützt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (TS 60/2-1) finanziert.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder in anderer Form veröffentlicht wurde und daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hannover, den 08. Mai 2000

Kurzfassung

Die S-Transnitrosylierungs-Reaktion zwischen S-Nitroso-Substanzen (RSNO) und Thiolen wird als das grundlegende Prinzip angesehen, mit der auf Stickstoffmonoxid (NO) zurückgehende biologische Aktivitäten *in vivo* reguliert werden. S-Nitroso-Albumin (SNALB) hat mit etwa 200 nM die höchste Konzentration aller S-Nitroso-Substanzen im Humanplasma. Niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen wie S-Nitroso-Cystein (SNC) und S-Nitroso-Glutathion (GSNO) sollen *in vivo* durch S-Transnitrosylierung aus SNALB und den entsprechenden niedermolekularen Thiolen gebildet werden und die biologischen Aktivitäten von SNALB wie Vasodilatation und Inhibition der Plättchenaggregation vermitteln. Der Mechanismus der Bildung und der Entfaltung der biologischen Aktivität von S-Nitroso-Substanzen, der Mechanismus der S-Transnitrosylierungs-Reaktion und der Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen *in vivo* sind bislang noch nicht hinreichend untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung der Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie sowie der hochauflösenden Flüssigchromatographie empfindliche, akkurate und Interferenz-freie Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen entwickelt und angewendet.

Die S-Transnitrosylierungs-Reaktion beruht auf der heterolytischen Spaltung der S-NO-Gruppe und verläuft ohne die Bildung von oxidierten Thiolen und NO. S-Transnitrosylierungs-Reaktionen laufen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Blut ab. Die Ermittlung von Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen ergab, daß S-Nitroso-Homocystein die am meisten bevorzugte und SNC die am wenigsten bevorzugte S-Nitroso-Substanz ist. Humane Erythrozyten besitzen ein spezifisches Transport-System für SNC. SNC wird in Erythrozyten zu biologisch inaktivem Nitrat und zu biologisch aktivem GSNO metabolisiert. Durch das Transport-System für SNC regulieren Erythrozyten den Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen. Cystein und seine S-Transnitrosylierungs-Reaktion zu SNC spielen eine zentrale Rolle für die Regulierung, den Metabolismus und die biologische Funktion von S-Nitroso-Substanzen. Die NO-Synthase- (NOS-) katalysierte Reaktion von L-Arginin zu NO und L-Citrullin führt in Gegenwart von Glutathion zur Bildung von GSNO. Sein Anteil an den Produkten der NOS liegt bei 2 % der NO-Synthese. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein endogener Inhibitor der NOS, welcher bei vielen Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose erhöht ist. Enzymkinetische Untersuchungen ergaben, daß ADMA ein nicht-kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase ist und schon unter physiologischen Bedingungen die NOS hemmt.

Schlagworte: S-Transnitrosylierung, S-Nitroso-Substanzen, asymmetrisches Dimethylarginin

Abstract

The S-transnitrosylation reaction between S-nitroso compounds and thiols is regarded as the basic principle by which nitric oxide- (NO-) related biological activities are regulated *in vivo*. S-nitrosoalbumin is the most abundant S-nitroso compound in human plasma and its concentration is about 200 nM. Low molecular weight S-nitroso compounds, i.e. S-nitrosocysteine (SNC) and S-nitrosogluthathione (GSNO), are reported to be generated *in vivo* by S-transnitrosylation reaction between SNALB and the corresponding thiols and to mediate the biological activities of SNALB such as vasodilation and inhibition of platelet aggregation. The mechanism of formation and mediation of biological activities of S-nitroso compounds and also the mechanism of the S-transnitrosylation reaction are still insufficiently explored. In the present work, sensitive, accurate and interference-free methods for the quantification of S-nitroso compounds were developed and applied. They are based on gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography.

The S-transnitrosylation reaction is based on the heterolytic cleavage of the S-N bond of the S-nitroso compounds. It is not accompanied by formation of oxidized thiols and NO. S-transnitrosylation reactions occur *in vitro* and *in vivo* in the blood. The determination of equilibrium constants of several S-transnitrosylation reactions showed homocystein as the most preferred and SNC as the most potent S-nitrosylating compound. Human erythrocytes possess a specific transport system for SNC. SNC is metabolized in human erythrocytes to biologically inactive nitrate and to biologically active GSNO. Erythrocytes regulate the metabolism of S-nitroso compounds via the specific transport system for SNC. Plasma cysteine which can be converted to SNC by S-transnitrosylation reaction with other S-nitroso compounds is apparently the key physiological thiol for the regulation of transport, metabolism and biological functions of S-nitroso compounds. In the presence of GSH, neuronal NO-Synthase (nNOS) catalyzes the conversion of L-arginine to GSNO which amounted to about 2 % of the total NO metabolites. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenous inhibitor of NOS that already inhibits NOS at physiological concentrations. Accelerated plasma-concentrations are associated with several diseases e.g. arteriosclerosis. Enzyme kinetics indicate that ADMA is a non-competitive inhibitor of NOS.

Keywords: S-transnitrosylation reaction, S-Nitroso compounds, asymmetric dimethylarginine

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
1.1	Bedeutung des <i>endothelium derived relaxing factor</i> , von NO und S-Nitroso-Substanzen.....	1
1.2	Chemie von NO und S-Nitroso-Substanzen.....	2
1.3	Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen	4
1.4	Biologische Aktivität und klinische Bedeutung von S-Nitroso-Substanzen.....	10
1.5	Endogenes Vorkommen und Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen	14
1.6	Biochemie der NO-Synthase	17
1.7	Methoden zur Analyse der Produkte von NO-Synthase und ihrer Aktivität.....	20
2	Zielsetzung	21
3	Material	22
3.1	Chemikalien	22
3.2	Reagenz-Lösungen	23
3.3	Pufferlösungen.....	24
3.4	HPLC-Eluenten	24
3.5	Biologisches Probenmaterial, Versuchstiere.....	25
3.6	Geräte	25
3.7	Weitere Materialien.....	26
4	Methoden.....	26
4.1	Literatur-Methoden	26
4.1.1	Bestimmung von Nitrit nach Griess	26
4.1.2	Messung von Nitrit und S-Nitroso-Substanzen nach Saville	27
4.1.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	27
4.1.4	Bestimmung von Thiolgruppen nach Ellman.....	27
4.1.5	Bestimmung von Cu ²⁺ mittels Bathocuproinsulfonat	27
4.1.6	Messung von NO in gepufferten wäßrigen Lösungen.....	28
4.1.7	Reduktion von Nitrat zu Nitrit	28
4.1.7.1	Reduktion in saurer Lösung	29
4.1.7.2	Reduktion in alkalischer Lösung.....	29
4.1.8	GC-MS-Bestimmung von Nitrit und Nitrat	29
4.1.9	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)	31
4.1.10	Extraktion von Proteinen mit Sephadex-PD 10-Säulen	31

4.1.11 Extraktion von GSNO mit microcon-SCX-Kartuschen	31
4.1.12 Messung der Plättchenaggregation.....	32
4.1.13 HPLC.....	32
4.1.13.1 HPLC-System A.....	33
4.1.13.2 HPLC-System B	34
4.1.14 Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen im Plasma mittels HPLC.....	34
4.1.15 Bestimmung von niedermolekularen Thiolen im Plasma mittels HPLC	35
4.1.16 Synthese von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen	35
4.1.17 Präparation des Versuchstieres für die Langzeit-Infusion von GS ¹⁵ NO	35
4.2 Eigene Methoden.....	36
4.2.1 Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs- Reaktionen	36
4.2.2 Herstellung von [¹⁴ C]S ¹⁵ NC aus [¹⁴ C]Cystin	37
4.2.3 S-Transnitrosylierungs-Experimente mit gewaschenen Erythrozyten	38
4.2.4 Herstellung von synthetischem SNALB und Analyse von SNALB mittels GC-MS	40
4.2.4.1 Synthese und Analyse von SNALB-Standards	40
4.2.4.2 Synthese von Butyl[¹⁵ N]nitrit	43
4.2.4.3 GC-MS-Bestimmung von SNALB in Human-Plasma nach Nitritfreisetzung mit HgCl ₂	44
4.2.4.4 Validierung der Methode für die Bestimmung von SNALB in Human-Plasma	47
4.2.4.5 Untersuchungen zu Interferenzen bei der Analyse von SNALB in Plasma	49
4.2.5 Bestimmung von GSNO und SNC mittels GC-MS	50
4.2.5.1 Bestimmung von GSNO, SNC und Nitrit in gepufferten wässrigen Lösungen	50
4.2.5.2 Bestimmung von GSNO und SNC in menschlichem Plasma-Ultrafiltrat mittels GC-MS.....	52
4.2.6 Qualitativer Nachweis von [¹⁵ N]Nitrit und ¹⁵ N-markierten S-Nitroso-Substanzen.....	54
4.2.7 Bestimmung von GSNO mittels HPLC mit Fluoreszenz- und UV-Absorptions-Detektion nach Vor-Säulen-Derivatisierung mit OPA.....	55
4.2.7.1 HPLC-System B	55

4.2.7.2	Isolierung von GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten und wäßrigen Lösungen	55
4.2.7.3	Derivatisierungs-Prozeduren	55
4.2.7.4	Entwicklung, Optimierung und Validierung der Methode.....	56
4.2.8	Untersuchung der Aktivität von neuronaler NOS-Aktivität <i>in vitro</i>	64
4.2.8.1	NOS-Assay mittels GC-MS	64
4.2.8.2	Optimierung der Inkubationsbedingungen	65
4.2.8.3	Bestimmung der spezifischen Aktivität der neuronalen NOS.....	66
4.2.8.4	Untersuchung der Wirkung der NOS-Inhibitoren L-NNA, L-NMA, L-NAME und SDMA auf die NOS-Aktivität	66
4.2.8.5	Ermittlung enzymkinetischer Daten der ungehemmten und mit ADMA gehemmten NOS.....	67
4.2.9	Trennung von [¹⁵ N]Nitrit und GS ¹⁵ NO in NOS-Ansätzen in Gegenwart von GSH	70
4.2.10	Quantifizierung von Hydroxylamin mittels GC-MS.....	71
5	Ergebnisse	72
5.1	Untersuchungen zur Stabilität und NO-Freisetzung von S-Nitroso-Substanzen in pH-neutralen gepufferten wäßrigen Lösungen.....	72
5.1.1	Einfluß von Cu ²⁺ und Cystein auf die NO-Freisetzung aus SNC in Puffer A	73
5.1.2	Einfluß von Cystein auf die Stabilität von SNC in Puffer A.....	74
5.1.3	Vergleich der NO-Freisetzung aus SNC, GSNO, SNAC und SNALB in Puffer A.....	77
5.1.4	NO-Freisetzung aus SNC in Puffer A in Gegenwart von HSA	77
5.1.5	Vergleich der NO-Freisetzung aus SNC und SNhC in Puffer	79
5.1.6	Einfluß von Albumin- bzw. SNALB-gebundenem Cu ²⁺ auf die Reaktion von S ¹⁵ NALB zu [¹⁵ N]Nitrit	80
5.2	S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in wäßrigen gepufferten Lösungen.....	81
5.2.1	NO-Bildung bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen	82
5.2.2	Bildung von Hydroxylamin aus Angeli's Salz und in S-Transnitrosylierungs-Reaktionen.....	83
5.2.3	S-Transnitrosylierung von GSH durch [¹⁴ C]SNC.....	84
5.2.4	S-Transnitrosylierung von nicht markiertem Cystein durch [¹⁴ C]SNC.....	84
5.2.5	Reaktion von SNALB mit Cystein in Gegenwart von [¹⁴ C]Cystein.....	85
5.2.6	Reaktion von SNP mit Cystein in Gegenwart von [¹⁴ C]Cystein bzw. mit GSH und NAC	86

5.2.7	Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen	87
5.2.8	S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in einem quartenären Gemisch aus GSNO, SNC, SNAC und SNAP und ihren Thiolen	88
5.3	(S-Trans)nitrosylierungs-Reaktionen in Plasma und Vollblut	89
5.4	Transport und Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen in humanen Erythrozyten ...	93
5.4.1	Identifikation von intrazellulär gebildetem GS ¹⁵ NO in menschlichen Erythrozyten	93
5.4.2	Abhängigkeit der GSNO-Bildung in Erythrozyten von der Inkubationszeit und der SNC-Konzentration	95
5.4.3	Abhängigkeit der GSNO-Bildung in menschlichen Erythrozyten von verschiedenen S-Nitroso-Substanzen, authentischem NO, NONOat und Angeli's Salz	97
5.4.4	Inhibition der SNC-abhängigen GSNO-Bildung in gewaschenen Erythrozyten durch Aminosäuren	98
5.4.5	Vergleich des Transportes von Cystein und SNC in das Erythrozyten-Cytosol	100
5.4.6	Kinetische Untersuchungen zum Transport von SNC in Erythrozyten	101
5.4.7	Bilanzierung des Transportes von SNC in gewaschenen Erythrozyten	102
5.4.8	Bestimmung von GSNO im Erythrozyten-Cytosol nach Inkubation von S ¹⁵ NC in Vollblut	102
5.4.9	S ¹⁵ NALB-Bildung in Plasma nach Inkubation mit S ¹⁵ NC vorinkubierten gewaschenen Erythrozyten	103
5.4.10	Inhibition der ADP-induzierten Plättchenaggregation in plättchenreichem Plasma durch mit S ¹⁵ NC vorinkubierte und gewaschene Erythrozyten	104
5.4.11	Speicherung von GSNO in Erythrozyten, resuspendiert in Plasma und physiologischer NaCl-Lösung	105
5.4.12	Metabolismus von GSNO in Blut, Plasma und gewaschenen Erythrozyten in An- und Abwesenheit von Cystein	107
5.4.13	Einfluß von exogenem Cystein auf den zeitlichen Verlauf der Metabolisierung von GSNO in gewaschenen Erythrozyten	111
5.4.14	Metabolismus von NO in gewaschenen humanen Erythrozyten	112

5.5	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zum Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen	
	an der Ratte.....	113
5.5.1	Intravenöse Bolus-Injektion von SNC und [¹⁴ C]SNC in eine Ratte	114
5.5.2	Langzeit-Infusion von GS ¹⁵ NO in eine Ratte	115
5.5.3	Bestimmung von GSNO im Rattenplasma nach i.v. Infusion von GSNO.....	118
5.6	Vorkommen von endogenen S-Nitroso-Substanzen im Plasma und	
	in Erythrozyten von Menschen.....	120
5.7	Reaktionsprodukte der neuronalen NO-Synthase bei der Inkubation von	
	Arginin in Gegenwart und Abwesenheit von GSH	121
5.7.1	Inkubation von NOS mit L-[¹⁵ N ₂]Arginin in Gegenwart von GSH	121
5.7.2	Stabilität von GS ¹⁵ NO in NOS-Ansätzen	124
5.7.3	Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in NOS-Ansätzen	125
5.7.4	Messung von NO in NOS-Ansätzen	126
5.8	Unterscheidung zwischen GSNO und GSNO ₂	126
6	Diskussion	130
6.1	Neu- und weiterentwickelte Methoden	130
6.1.1	Analyse von SNALB mittels GC-MS	130
6.1.2	Analyse von GSNO und SNC mittels GC-MS.....	137
6.1.3	Analyse von GSNO als OPA-GSH-Derivat mittels HPLC.....	138
6.1.4	Bestimmung der Aktivität von isolierter neuronaler NO-Synthase	
	mittels GC-MS	140
6.2	S-Transnitrosylierungs-Reaktionen.....	143
6.2.1	S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in gepufferten wäßrigen Lösungen.....	143
6.2.2	S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in menschlichem Plasma und Blut	152
6.2.3	Rolle von Erythrozyten bei dem Metabolismus und der	
	Vermittlung der biologischen Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen.....	157
6.2.4	Untersuchungen zum Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen in vivo	
	an der Ratte	161
6.2.5	Entstehung von GSNO als Produkt der NOS-katalysierten	
	Reaktion von L-Arginin	162
6.3	Zusammenfassung, Schlußfolgerungen und Ausblick	164
6.3.1	Zusammenfassung	164
6.3.2	Schlußfolgerungen.....	168
6.3.3	Ausblick	171

7	Literaturverzeichnis.....	173
	Anhang.....	187
	Abkürzungsverzeichnis.....	187
	Lebenslauf.....	189
	Publikationen.....	190
	Originalarbeiten.....	190
	Abstracts.....	191
	Weitere Publikationen ohne direkten Bezug zu der vorliegenden Dissertation.....	191

1 Einführung

1.1 Bedeutung des *endothelium-derived relaxing factor*, von NO und S-Nitroso-Substanzen

Im Jahre 1980 entdeckten Furchgott *et al.*, daß isolierte Blutgefäße von Kaninchen durch Gabe des Neurotransmitters Acetylcholin dilatieren. Dieser Effekt trat jedoch immer nur dann auf, wenn das Endothel dieser Blutgefäße nach ihrer Präparation noch intakt war. Diese Beobachtung führte zu dem Schluß, daß nicht Acetylcholin selbst auf die glatte Gefäßmuskulatur als Dilator wirkt, sondern eine aus den Endothelzellen stammende, durch Acetylcholin freigesetzte Substanz. Diese Substanz konnte jedoch nicht isoliert und identifiziert werden, was darauf hindeutete, daß sie sehr reaktiv und kurzlebig ist. Sie wurde als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnet [1].

Die vasodilatatorische Eigenschaft von Glyceryltrinitrat (GTN) ist schon sehr lange bekannt. So hat schon Alfred Nobel selbst gegen seine Angina Pectoris GTN eingenommen. Murad *et al.* berichteten 1983, daß die vasodilatatorische Aktivität von organischen Nitraten auf eine NO-Freisetzung zurückgeht, die wiederum zur Bildung des *second messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) führt [2]. Ignarro *et al.* fanden 1986 heraus, daß EDRF ebenfalls zur cGMP-Bildung führt [3]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte schließlich im Jahre 1987 beweisen, daß EDRF und NO identische chemische und pharmakologische Eigenschaften haben [4].

Der vasodilatatorische Effekt von NO-Donoren wie GTN und Natriumnitroprussid (SNP) ist abhängig von der Anwesenheit reduzierter Thiole [5]. Es wurde angenommen, daß NO-Gruppen enthaltende Intermediate von Thiolen, nämlich S-Nitroso-Substanzen (allgemeine Formel: R-S-N=O), verantwortlich für die Entfaltung der biologischen Aktivität von solchen NO-Donoren sind [5].

Im Jahre 1992 berichteten Stamler *et al.*, daß EDRF in menschlichem Plasma vorwiegend in Form von S-Nitroso-Albumin (SNALB), und zwar in Konzentrationen von $7 \pm 5 \mu\text{M}$ vorkommt [6]. Später postulierten Stamler *et al.*, daß die Aktivität von SNALB durch niedermolekulare reduzierte Thiole wie Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) vermittelt wird [7]. S-Nitroso-Substanzen (RSNO) sind nämlich in der Lage, Thiole (RSH) zu S-nitrosylieren, wodurch aus den Thiolen andere S-Nitroso-Substanzen entstehen. Diese Reaktion ($\text{RSNO} + \text{R}'\text{SH} \rightleftharpoons \text{RSH} + \text{R}'\text{SNO}$) wird als S-Transnitrosylierung bezeichnet.

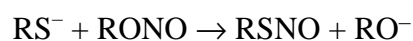
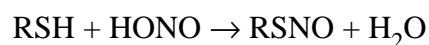
Neben der Vasodilatation ist eine seit langem bekannte Eigenschaft von NO und S-Nitroso-Substanzen die Inhibition der Aggregation von Blutplättchen. Auch diese Eigenschaft wird – wenigstens zum Teil – durch die Aktivierung der löslichen Guanylat-Cyclase (sGC), also über die Bildung von cGMP in den Plättchen, vermittelt [8,9,10].

Endothelzellen [11] und auch Plättchen [12] produzieren NO über ein Enzym, die NO-Synthase (NOS). Es konvertiert L-Arginin zu Citrullin und NO. In der Gegenwart von Glutathion wurde *in vitro* die Bildung von S-Nitroso-Glutathion (GSNO) als Produkt der NOS identifiziert [13,14].

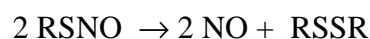
S-Nitroso-Substanzen sind nicht nur potente NO-Donoren, sondern besitzen per se eine biologische Aktivität. Schon 1990 publizierten Kowaluk und Fung [15], daß S-Nitroso-Substanzen unabhängig von ihrer NO-Freisetzung biologische Aktivitäten entfalten. Die Arbeitsgruppe von Stamler machte die Entdeckung, daß S-Nitroso-Substanzen auch Nitrosonium- (NO^+) bzw. Nitroxyl- (NO^-)-Donoren sind [16]. S-Nitroso-Substanzen sind nach Stamler *et al.* in der Lage, Proteine zu S-nitrosylieren (an reduzierten Cystein-Gruppen) und können so die Eigenschaften der Proteine beeinflussen [17].

1.2 Chemie von NO und S-Nitroso-Substanzen

S-Nitroso-Substanzen, auch Thionitrite genannt, sind die Schwefel-Analoga der besser untersuchten Alkylnitrite. Über die Chemie von S-Nitroso-Substanzen ist vieles noch unbekannt [18]. S-Nitroso-Substanzen können durch die Reaktion von Thiolen mit salpetriger Säure, Distickstofftrioxid (N_2O_3) oder Alkylnitriten hergestellt werden [19].



Es gilt lange als gesichert, daß S-Nitroso-Substanzen zu den korrespondierenden Disulfiden und NO homolytisch zerfallen:



Diese Reaktion kann photochemisch [20] oder thermisch [21] hervorgerufen werden. Ferner ist mittlerweile auch eine Metallionen-katalysierte Variante dieser Reaktion bekannt [22]: In der Abwesenheit von Kupfer-Ionen sind Lösungen von S-Nitroso-Substanzen verhältnismäßig stabil. Allerdings sind sogar Kupfer-Ionen-Konzentrationen von 10^{-7} M ausreichend, um die Zersetzung von S-Nitroso-Substanzen erheblich zu beschleunigen. Heute geht man davon aus, daß nicht Cu^{2+} , sondern Cu^{1+} der wirkliche Katalysator dieser Reaktion ist [23]. Das Cu^{2+} soll dabei durch Reaktion von Thiolen in der Lösung zu Cu^{1+} reduziert werden. Die Thiole kommen als Verunreinigung in Spuren vor und sollen auch bei der Zersetzung von S-Nitroso-Substanzen entstehen. Ob Cu^{1+} eine biologische Rolle bei der NO-Freisetzung aus endogenen S-Nitroso-Substanzen zukommt, ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt. Allerdings wurde von Grodge *et al.* [24,25] die Beobachtung gemacht, daß Cu^{1+} die antiaggregierende Wirkung von S-Nitroso-Substanzen auf Plättchen herabsetzt. Daß Protein-gebundenes Cu^{2+} zu einer NO-Freisetzung aus S-Nitroso-Substanzen führt, ist bekannt [26].

Trotz der Instabilität von S-Nitroso-Substanzen konnten wenigstens zwei, nämlich S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) [27] und GSNO [28], in kristalliner Form präpariert und charakterisiert werden. Von SNAP ist bekannt, daß es sich bei Temperaturen über 150°C unter NO-Freisetzung zersetzt [29]. In Lösung haben S-Nitroso-Substanzen Absorptions-Maxima in den Regionen von 330-350 und 550-600 nm [30,31,32]. Diese Eigenschaft wurde u.a. genutzt, um ihre Zersetzung zu untersuchen.

Die Reaktivität von NO hängt von der Elektronenkonfiguration des $2p-\pi$ antibindenden Orbitals von NO ab [33]. Die Gegenwart eines einzelnen Elektrons in diesem Orbital führt nicht zu einer hohen Reaktivität mit Thiolen (R-SH). Eine Reaktion mit Thiyl-Radikalen ist allerdings möglich. Der Verlust eines Elektrons führt zu NO^+ , das eine hohe Elektrophilie besitzt. NO^+ weist eine hohe Reaktivität mit den meisten physiologisch vorkommenden Thiolen auf. Auf der Reaktion von NO^+ mit Thiolen basieren auch die Synthese-Methoden von S-Nitroso-Substanzen. Ein weiteres Elektron im $2p-\pi$ -Orbital (NO^-) kann zur gesteigerten Reaktionsfähigkeit mit relativ elektropositiven Thiolen führen, vor allem in der Gegenwart von Eisen- oder anderen Übergangsmetall-Ionen [16,33,34]. Es wurde berichtet, daß die NO-Synthase auch Lachgas (N_2O) und Hydroxylamin (NH_2OH) über die Bildung von NO^- produziert [13]. Ferner kann die NOS-katalysierte Coproduktion von NO und Superoxid

($\text{O}_2^{\cdot-}$) zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) führen. Dies ist eine potente nitros(yl)ierende Spezies.

Die Reaktion von NO mit Sauerstoff zu Distickstofftrioxid (N_2O_3) ist unter physiologischen Bedingungen relativ langsam (Geschwindigkeitskonstante $k \approx 6,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [35]. Die nitrosierende Spezies läßt sich hier als $\text{NO}^+ \cdots \text{NO}_2^-$ formulieren. Diese Reaktion kann um den Faktor 300 beschleunigt sein, wenn sie im hydrophoben Zentrum biologischer Membranen stattfindet [36]. Die Reaktion von NO mit Superoxid ist hingegen außerordentlich schnell ($k \approx 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und somit Diffusions-limitiert [37]. Sowohl Amine als auch Sulfhydryl-Gruppen reagieren sehr schnell mit N_2O_3 und ONOO^- [13,36,38,39]. Die Thiol-Nitrosylierung ist unter physiologischen Bedingungen bevorzugt [40]. Die Reaktivität von N_2O_3 und ONOO^- gegenüber Kohlenstoffzentren ist noch niedriger als die gegenüber Aminen.

Nitronium-Ionen (NO_2^+) reagieren im Gegensatz zu NO^+ bevorzugt mit elektronenreichen Kohlenstoffzentren in aktivierten Aromaten. So reagiert NO_2^+ mit Tyrosin unter physiologischen Bedingungen, besonders in Gegenwart von Kohlendioxid, zu 3-Nitrotyrosin [37,41,42]. Die S-Nitrosylierung von Thiolen mit NO kann durch Elektronen-Transfer in Eisen-Nitrosyl-Gruppen *in vitro* erleichtert werden [34].

1.3 Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen

Eine verlässliche Bestimmung von endogenen S-Nitroso-Substanzen in biologischen Flüssigkeiten gestaltet sich als sehr schwierig. Die Ursache liegt zum einen darin, daß vor allem niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen recht instabil sind. Übergangsmetall-Ionen, insbesondere Cu^{2+} - oder Cu^{1+} -Ionen, wirken sich extrem destabilisierend aus [22,23]. Andererseits können S-Nitroso-Substanzen unter bestimmten Bedingungen sehr leicht gebildet werden: In Gegenwart von Thiolen kommt es bereits unter fast pH-neutralen Bedingungen ($\text{pH} \leq 6$) zu einer merklichen artifiziellen Bildung von S-Nitroso-Substanzen aus ubiquitär vorkommendem Nitrit. Da physiologische S-Nitroso-Substanzen in sehr geringen Konzentrationen im Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten vorkommen können, kann die artifizielle Bildung dieser Substanzen die endogene Bildung sogar übersteigen. Jede analytische Methode zur quantitativen Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen sollte daher kritisch in Bezug auf Interferenzen untersucht werden.

In Tab. 1 sind die im folgenden beschriebenen Methoden zur Bestimmung von NO und S-Nitroso-Substanzen zusammengestellt.

Tab. 1. Methoden zur Bestimmung von NO und S-Nitroso-Substanzen.

Substanz/Substanzklasse	Methode	Literatur
S-Nitroso-Substanzen	Spektrophotometrie (340 bzw. 540 nm) Direkt oder nach Trennung durch HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>)	[30,31,32] [14,43,44]
NO und S-Nitroso-Substanzen	Chemilumineszenz in Kombination mit photolytischer Spaltung der S-NO-Bindung, z.T. nach Trennung durch HPLC	[45] [6]
S-Nitroso-Substanzen	Kapillar-Elektrophorese	[46]
Niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen	Direkte Bestimmung mittels ESI-MS	[47,48,49,50]
NO und GSNO	Clark-Elektrode, elektrochemische Detektion von NO, nach NO-Freisetzung aus GSNO mittels Cu^{1+}	[12,51,52] [14,53]
NO	Reaktion von Oxyhämoglobin mit NO zu Methämoglobin, colorimetrisch	[54]
NO	Reaktion mit Thioprolin und Analyse als <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid-Derivat	[55]
Nitrit und S-Nitroso-Substanzen	Griess-Methode, Kupplung von Nitrit und aromatischen Aminen zu Diazo-Farbstoffen, spektrophotometrisch. Zersetzung der S-Nitroso-Substanzen zu Nitrit und seine Bestimmung nach Griess (Saville-Methode)	[56] [57]
Nitrit und SNALB	Als Pentafluorobenzyl-Derivat mittels GC-MS. Isolierung von SNALB mittels HiTrapBlue Sepharose (Affinitätschromatographie), Zersetzung von SNALB zu Nitrit und seine Bestimmung als Pentafluorobenzyl-Derivat	[58] [59,60,61]
Nitrat	Nach der Derivatisierung mit Aromaten zu Nitroaromaten mittels GC-MS	[62,63]

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Diplomarbeit [59] und die auf ihr basierenden Publikationen sind fett gedruckt.

Eine direkte Bestimmung von endogenen S-Nitroso-Substanzen in biologischen Flüssigkeiten ist aufgrund ihrer recht kleinen Absorption in den Bereichen um 340 bzw. 540 nm (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon \approx 800$ bzw. $20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nicht möglich.

Die photolytische Spaltung der S-NO-Bindung mit anschließender Detektion des freigesetzten NO mittels Chemilumineszenz stellt eine Methode zur Quantifizierung von S-Nitroso-Substanzen dar. Auf diesem Prinzip basieren die ersten von Stamler *et al.* publizierten Daten über endogen im menschlichen Plasma vorhandenes SNALB [6]. Diese Methode hat große Bedeutung zur Bestimmung von NO als Luftschadstoff erlangt. Mit ihr können NO-Konzentrationen bis 10^{-13} M detektiert werden [45,64]. Die Bestimmung der Konzentration von SNALB im Human-Plasma [6] erfolgte ohne eine vorherige Isolierung von SNALB, d.h. durch direkte Injektion von Plasma-Proben in die Photolyse-Zelle. Daten zur Zuverlässigkeit zu möglichen

Interferenzen bei der Bestimmung von SNALB im Plasma mittels Chemilumineszenz liegen nicht vor.

Eine Möglichkeit der direkten Detektion von S-Nitroso-Substanzen ist die hochauflösende Kapillar-Elektrophorese bei Spannungen von 10 bis 30 kV und Verwendung von dünnen *fused silica* Kapillaren. Diese Methode hat den Vorteil, daß der Aufwand der Proben-Vorbereitung sehr gering ist, die erreichte Auflösung groß und die benötigten Probenvolumina klein sind. Mittels Kapillar-Elektrophorese ist eine Trennung von Thiolen, Disulfiden und S-Nitroso-Substanzen möglich [46]. Nachteile dieser Methode bestehen unter anderem darin, daß sie nicht empfindlich genug zur Detektion von S-Nitroso-Substanzen in physiologischen Konzentrationen ist.

Eine weitere Möglichkeit für die Bestimmung intakter S-Nitroso-Substanzen in *in vitro*-Untersuchungen ist die Kombination von HPLC und UV-Detektion bei Wellenlängen um 340 nm. Die Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen ist hier nur im mikromolaren Bereich möglich [43]. Der Nachteil dieser Methoden besteht in der Gefahr einer artifiziellen Bildung von S-Nitroso-Substanzen aus Thiolen und Nitrit, da Eluenten niedrigen pH-Wertes benötigt werden [14,43]. Schon im Injektor können aus Thiolen und Nitrit die entsprechenden S-Nitroso-Substanzen gebildet werden.

Mittels Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) können intakte S-Nitroso-Substanzen gemessen werden [47,48,49,50]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Struktur-Aufklärung von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen verwendet. Eine Messung von SNALB in Gegenwart von Albumin ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Der Unterschied von SNALB und Albumin in der Molekülmasse ist zu gering. Diese Methode könnte in der Zukunft zur direkten Quantifizierung von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen nach ihrer chromatographischen Auftrennung eine Bedeutung erlangen. Sie erlaubt die Verwendung von authentischen, ^{15}N -markierten S-Nitroso-Substanzen als interne Standards.

Wie auch die bereits diskutierte Chemilumineszenz-Methode basieren die weiteren analytischen Methoden für S-Nitroso-Substanzen auf der Freisetzung von NO und dessen direkter oder indirekter Analyse, z.B. als Nitrit oder Nitrat.

Eine auch in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode zur Messung von NO in wäßrigen Lösungen ist die elektrochemische Detektion, z.B. mit einer sogenannten Clark-Elektrode. Sie ist im Prinzip eine modifizierte Sauerstoff-Elektrode und besteht aus einem Platindraht, an dem die Oxidation von NO stattfindet und einem Silberdraht als Gegenelektrode [51]. An der Elektrode liegt ein konstantes Potential an. Das wesentliche Prinzip dieses Sensors ist, daß NO durch eine gasdurchlässige Membran diffundiert und an der Elektrode oxidiert wird. Die frei werdenden Elektronen liefern einen elektrischen Strom, der zur NO-Konzentration im Meßgefäß proportional ist. Die NO-Konzentration an der Elektrode ist nicht allein von der NO-Konzentration im Reaktionsgefäß, sondern auch von der Diffusionsgeschwindigkeit durch die Membran abhängig. Diese ist wiederum abhängig von der Temperatur und von den Verunreinigungen an der Membran, z.B. durch ausgefallene Proteine. Deshalb ist diese Methode in biologischen Flüssigkeiten sehr störanfällig. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell von WPI war die Empfindlichkeit der einzelnen Elektroden unterschiedlich. Ferner nahm die Empfindlichkeit mit der Zeit stark ab. Mittels einer Clark-Elektrode wurde GSNO, das zur Detektion mit Cu^{1+} -Ionen zu NO zersetzt wird [14], als Produkt der NOS gemessen.

Malinski und Taha [52] entwickelten eine sehr kleine Elektrode (0,2-1 mm Durchmesser), bei der NO mittels polymerem Metalloporphyrin oxidiert wird. Diese Sensoren haben schnelle Reaktionszeiten (10 ms) und ein Detektionslimit von $1 \cdot 10^{-8}$ M. Mit einer solchen Elektrode konnten Malinski und Taha *in vitro* den Transport von NO von Endothelzellen zum glatten Gefäßmuskel verfolgen [52] und die NO-Freisetzung bei der Plättchenaggregation [12] demonstrieren. Derartige Elektroden sind noch nicht kommerziell erhältlich.

NO kann *in vitro* am einfachsten colorimetrisch durch Konvertierung von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin bestimmt werden. Auf diesem Verfahren basiert auch eine Methode zur Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität [54]. Für eine akkurate Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen ist diese Methode ungeeignet.

Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) kann NO direkt oder vorzugsweise indirekt nach Reaktion mit Thioprolin und anschließender Analyse als *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoroacetamid-Derivat bestimmt werden. Diese Methode wurde zur Validierung der Chemilumineszenz-Methode zur Bestimmung von NO in Atemluft verwendet [55].

Sie könnte auch zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen geeignet sein. Es existieren darüber allerdings noch keine Publikationen.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen, auf die in den meisten Fällen auch in der vorliegenden Arbeit zurückgegriffen wurde, besteht in der Umwandlung der S-Nitroso-Gruppe zu Nitrit. In Analogie zur Saville-Methode [57] kann die quantitative Zersetzung von S-Nitroso-Substanzen mittels Hg^{2+} -Ionen erreicht werden. Quecksilber hat eine hohe Affinität zu sulfidischem Schwefel, so daß die S-N-Bindung geschwächt wird und schließlich unter Anlagerung von Wasser salpetrige Säure freigesetzt wird (Abb. 1).

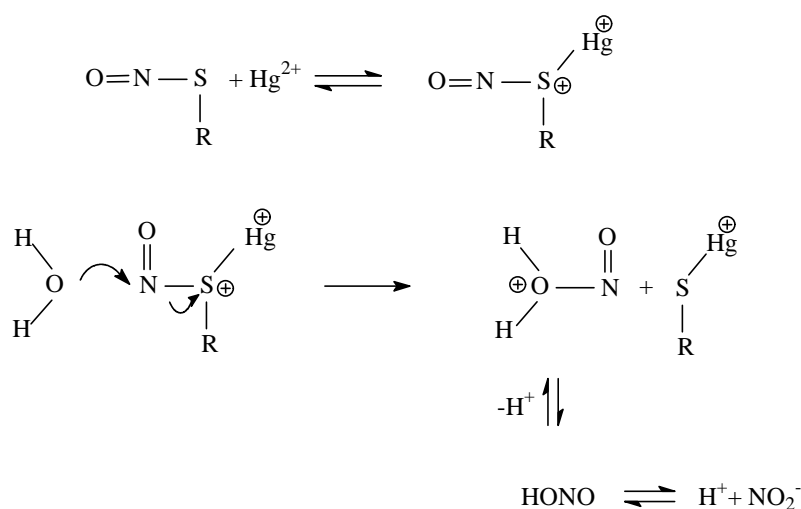
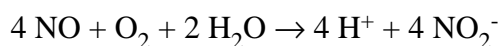


Abb. 1. Reaktionsschema der Nitrit-Bildung aus S-Nitroso-Substanzen in Gegenwart von HgCl_2 . Nach [57].

Mit der Saville-Methode wird also nicht allein die S-Nitroso-Konzentration, sondern die Summe von S-Nitroso- und Nitrit-Konzentration bestimmt. Eine weitere Möglichkeit der Zersetzung von S-Nitroso-Substanzen zu Nitrit besteht in der Verwendung von Kupfer-Ionen. Das durch die Spaltung der S-Nitroso-Gruppe freigesetzte NO reagiert in sauerstoffhaltigen wäßrigen Lösungen rasch zu Nitrit weiter [35]:



Die einfachste und älteste Methode zur Nitrit-Bestimmung ist die Griess-Methode [56]. Sie beruht auf der Reaktion von Nitrit im Sauren zum Nitrosyl-Kation und dessen Kupplung mit aromatischen Aminen zu Diazoniumverbindungen, deren Kupplung mit einem weiteren aromatischen Amin zu Diazofarbstoffen führt. Diese können spektrophotometrisch gemessen

werden. Als Amin dient bei der Griess-Analytik z. B. Sulfanilsäure, als aromatisches Amin z.B. N-(1-Naphthyl)ethyldiamin. Detaillierte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [43] zeigten, daß die Griess-Methode in biologischen Proben zu zahlreichen Interferenzen neigt.

Die Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen nach ihrer Zersetzung mittels HgCl_2 zu Nitrit kann am besten mittels GC-MS [58] erfolgen. Bei dieser Methode werden Nitrit und Nitrat als Pentafluorobenzyl-Derivate (PFB-NO_2 bzw. PFB-ONO_2) gemessen. Im Massenspektrometer entstehen im *negative ion chemical ionization*- (NICI)-Modus Fragmente mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 46 (Nitrit) bzw. 62 (Nitrat). Unter Verwendung von ^{15}N -markierten Substanzen als interne Standards gelingt eine zuverlässige, Interferenz-freie und hochempfindliche Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in allen biologischen Flüssigkeiten [43]. Bei der Nitrat-Bestimmung nach Reduktion des Nitrats zu Nitrit ist eine Interferenz durch GSNO möglich. Diese Interferenz tritt bei der Nitrit-Bestimmung nicht auf [65]. Sie spielt jedoch aufgrund der im Vergleich zu Nitrat vernachlässigbaren endogenen Konzentration von GSNO im Plasma keine Rolle.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit [59] wurde eine Methode zur Bestimmung von SNALB in menschlichem Plasma entwickelt. Sie beruht auf der selektiven Extraktion von SNALB mittels Affinitätschromatographie (HiTrapBlue Sepharose), der anschließenden Zersetzung der S-Nitroso-Gruppe von SNALB und des internen Standards S^{15}NALB mittels HgCl_2 zu Nitrit und dessen Derivatisierung mit PFB-Bromid [60,61]. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt und wird daher detailliert im Methoden-Teil beschrieben. Auf demselben Ansatz basierend wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode für die niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO [66] entwickelt. Sie wurde auch zur *in vivo*- und *in vitro*-Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität eingesetzt (s. Methodenteil).

Eine alternative GC-MS-Methode zur Bestimmung von Nitrat und Nitrit beinhaltet die Oxidation von Nitrit zu Nitrat und die Derivatisierung von Nitrat mit Benzol oder anderen Aromaten zum Nitrobenzol bzw. Nitroaromaten. Sie ist auch zur Bestimmung von Nitrat in biologischen Flüssigkeiten wie Plasma, Blut oder Urin angewendet worden [62,63]. Die Methode hat den Nachteil, daß die Derivatisierung in Gegenwart von konz. Schwefelsäure durchgeführt werden muß. Es wurde gezeigt, daß diese Methode zur Nitrat-Bestimmung in Plasma ungeeignet ist, da ein breites Spektrum von Nitroso-Verbindungen zu Interferenzen führt [67]. Ein weiterer entscheidender Nachteil dieser Methode besteht darin, daß Nitrit erst nach Konvertie-

rung zu Nitrat bestimmt werden kann. Das ist insbesondere bei der Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen im Plasma und Urin von Nachteil, da sowohl im Blut als auch im Urin die Nitrat-Konzentrationen um 1-2 Größenordnungen höher sind als die Nitrit-Konzentrationen (Beispiel: Nitrat im Plasma: ca. 30 μM , Nitrit im Plasma: ca. 1 μM).

Zur Nitrit-Bestimmung muß von den mit dieser Methode erhaltenen Meßwerten die sehr hohe Nitrat-Konzentration abgezogen werden, was zu einem erheblichen Meßfehler führt oder gar eine Quantifizierung unmöglich macht. Die Methode zur Nitrit- und Nitrat-Bestimmung als PFB-Derivate mittels GC-MS ist dagegen weniger anfällig auf Interferenzen [43,65], und Nitrit kann direkt bestimmt werden. Bei der Bestimmung von Nitrat macht sich das gleichzeitig mitbestimmte Nitrit deutlich weniger bemerkbar und kann bei der Bestimmung von endogenem Nitrat sogar vernachlässigt werden.

Der gravierendste Nachteil bei der Verwendung von Nitrit als Meßparameter für S-Nitroso-Substanzen ist das ubiquitär vorhandene Nitrit. Es ist unbedingt erforderlich, alle verwendeten Lösungen und Reaktionsgefäße auf ihren Nitrit-Gehalt hin zu untersuchen. Der Beitrag von Nitrit aus Reagenzien und Wasser zum GC-MS-Meßsignal bei der Bestimmung von SNALB im Human-Plasma kann erheblich sein [59].

Neuschwander-Tetri und Roll [68] haben gezeigt, daß reduziertes Glutathion (GSH) spezifisch und empfindlich mittels HPLC und fluorometrischer Detektion nach Derivatisierung mit *orto*-Phthaldialdehyd (OPA) gemessen werden kann. Da GSH mittels *N*-Ethylmaleimid eliminiert und anschließend GSNO durch Reaktion mit einem Überschuß eines Thiols quantitativ in GSH umgewandelt werden kann, ist es möglich, GSNO mit Hilfe dieser Methode in niedrigen Konzentrationen zu bestimmen (s. Methodenteil).

1.4 Biologische Aktivität und klinische Bedeutung von S-Nitroso-Substanzen

In Abb. 2 sind die wichtigsten biologischen Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen dargestellt. Die biologischen Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen können zum einen über ihre Wirkung als NO-Donoren entfaltet werden, zum anderen aber auch durch sie selbst, das heißt über S-Transnitrosylierungs-Reaktionen.

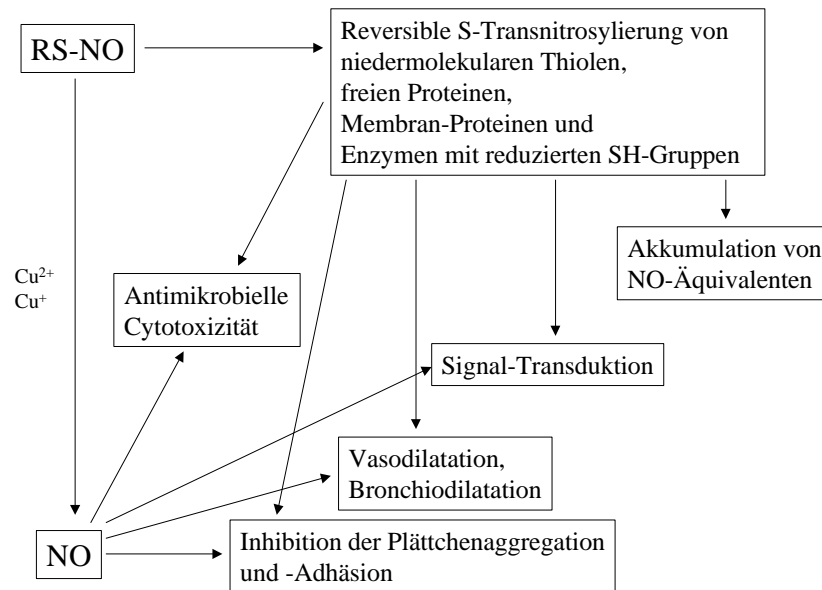


Abb. 2. Biologische Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen auf der Basis ihrer Eigenschaft als NO-Donoren bzw. als S-Transnitrosylierungs-Reaktionen.

Synthetische S-Nitroso-Substanzen sind, wie auch NO selbst, biologisch aktiv als Vasodilatoren [69,70]. Dabei gibt es einen Unterschied bezüglich der Effekte auf Venen und Arterien [71]: S-Nitroso-Substanzen haben einen deutlich stärkeren vasodilatatorischen Effekt auf Arterien als auf Venen (s.u.) Es ist bekannt, daß keine offensichtliche Korrelation zwischen der NO-Produktion *in vitro* und dem vasodilatatorischen Effekt dieser Substanzen existiert [72,73]. Kowaluk und Fung [15] schlugen vor, daß die NO-Produktion *in vivo* aus RSNO durch eine externe vaskuläre Membran katalysiert wird. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Im Gegensatz zu GTN wirken S-Nitroso-Substanzen als Vasodilatoren, ohne daß dabei eine Toleranzentwicklung auftritt [74,75]. Der Grund der Toleranzentwicklung bei der Therapie mit organischen Nitraten wie GTN ist noch nicht vollständig aufgeklärt. An dem Mechanismus der Toleranzentwicklung könnten Thiole beteiligt sein [76]. Eine Reihe von NO-Donoren wurde *in vivo* am Menschen auf ihre relative Potenz und arteriovenöse Selektivität untersucht [71]. GSNO wurde als äquipotent im Vergleich zu GTN an Arteriolen, aber 10-fach weniger potent an Venen befunden. Auch besitzt GSNO eine geringere Venoselektivität als SNP oder SIN-1 (3-(4-Morpholinyl)-sydnominin), was mit Vergleichen von SNAP mit diesen NO-Donoren übereinstimmt. Verschiedene arteriovenöse Profile unter NO-

Donoren sind von großem klinischem Interesse. Vor allem die gewebespezifischen regionalen Unterschiede in der NO-Freisetzung aus verschiedenen S-Nitroso-Substanzen sind vielversprechende Eigenschaften dieser Substanzen für ihre Fortentwicklung zu Medikamenten.

Die zweite entscheidende Eigenschaft von S-Nitroso-Substanzen ist ihre Wirkung auf Blutplättchen: Sie wirken der Plättchenaggregation und -Adhäsion entgegen [8,9,10].

Ein wesentlicher Vorteil von S-Nitroso-Substanzen bei der antiaggregatorischen Therapie gegenüber der Gabe von organischen Nitraten wäre, daß S-Nitroso-Substanzen weniger starke Vasodilatoren, dafür aber wesentlich potentere Antiaggregatoren sind [64]. Eine Reihe von hoch- und niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen wurde auf ihre antiaggregatorische Wirkung hin untersucht. Sie haben einen potenten, z.T. cGMP-abhängigen Effekt [64]. Für GSNO wurde gezeigt, daß es die Adhäsion von Plättchen an fibrillärem Collagen und an menschlichen Endothelzellen *in vitro* inhibiert, ebenso wie die ADP-induzierte Plättchenaggregation *in vivo* bei Ratten [77]. Diese Effekte von GSNO scheinen die Anwesenheit der γ -Glutamyltranspeptidase [78] vorauszusetzen. Auch andere Substanzen wie S-Nitrosocystein (SNC) [79], S-Nitroso-N-acetylcystein (SNAC) [80], SNAP [78] oder das hochmolekulare SNALB [81] besitzen antiaggregatorische Eigenschaften. Untersuchungen mit dem selektiven Inhibitor der löslichen sGC ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3]quinoxalin-1-on) [82] führten zu dem Ergebnis, daß auch cGMP-unabhängige Mechanismen bei der Hemmung der Plättchenaggregation durch S-Nitroso-Substanzen involviert sind [47]. GSNO ist ein sehr potenter Hemmer der Plättchenaggregation. Für die Aktivität von S-Nitroso-Substanzen bezüglich der antiaggregatorischen Eigenschaften wurde folgende Reihenfolge ermittelt: GSNO > NO > SNAP [77].

Gabe von NO-Gas in die Atemluft führte neben der Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur auch zu einer Muskel-Relaxation in der Lunge [83]. Letztere Eigenschaft ist für die Behandlung von Asthma äußerst interessant. Da NO aber mit Luftsauerstoff zum hoch-toxischen NO₂ reagiert, wäre die Gabe von geeigneten S-Nitroso-Substanzen, die erst am Wirkort NO freisetzen oder direkt wirken, ein interessanter alternativer Therapieansatz. S-Nitroso-Substanzen haben unabhängig von ihrer NO-Freisetzung bronchiodilatatorische Eigenschaften, die offenbar stärker sind als die von NO selbst. So haben Patienten mit schwerem Asthma eine deutlich verringerte GSNO-Konzentration in der Bronchialflüssigkeit (s.u.) und hohe ausgeatmete NO-Konzentrationen [84].

Eine weitere biologische Aktivität von S-Nitroso-Substanzen beruht auf ihrer Fähigkeit zur reversiblen Modifizierung von Proteinen durch S-Transnitrosylierungs-Reaktionen an reduzierten Cysteiny-Thiol-Gruppen und damit möglicherweise zur Signal-Transduktion. In der Tat ist heute bekannt, daß durch S-Nitrosylierung von Proteinen diese aktiviert oder auch deaktiviert werden können, ähnlich wie bei der Protein-Phosphorylierung. Durch diese Reaktionen wird z.B. die Inhibition von post-translationalem Protein-Transport vermittelt wie im Falle der Translokation der p47^{phox}-Untereinheit der NADPH-Oxidase zur Zell-Membran von Neutrophilen [85] zur transkriptionalen Regulation durch I κ B-Nitrosylierung [86]. Ferner werden wahrscheinlich metabolische Prozesse durch S-Nitrosylierung reguliert, wie z.B. die Aktivierung des Hexose-Monophosphat-Wegs [87]. Von Interesse ist auch, daß GSNO und andere S-Nitroso-Substanzen Enzyme zu inhibieren vermögen, die mit der Antwort auf oxidativen Streß in eukariotischen Zellen assoziiert werden wie z.B. die Glutathion-Peroxidase [88,89], Glutathion-Reduktase [90], Glutathion-S-Transferasen [91] und die γ -Glutamyl-cystein-Synthase [92].

S-Transnitrosylierungen finden auch zwischen hochmolekularen (z.B. SNALB) und niedermolekularen Thiolen statt. Man geht davon aus, daß hochmolekulare S-Nitroso-Substanzen wie SNALB im Plasma als NO- bzw. S-Nitroso-Reservoirs dienen [7]. Für niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen wie das reaktive und biologisch ausgesprochen aktive SNC wird hingegen angenommen, daß sie als Mediatoren zur Vermittlung der biologischen Aktivitäten dienen. NO hat *in vivo* eine Halbwertszeit von 0,1 s [93], während SNALB wesentlich langlebiger ist. Es konnte von Stamlers Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß Co-Injektion von SNALB und Cystein in Kaninchen zu einer Verstärkung und Verkürzung der vasodilatatorischen Wirkung von SNALB führte [7]. Dieser Effekt wurde der intermediären Bildung von SNC durch die S-Transnitrosylierungs-Reaktion von SNALB mit Cystein zugeschrieben, das SNC aber nicht explizit nachgewiesen. Auch für den Wirkmechanismus des NO-Donoren NOC7 wurde die Beteiligung von SNALB und dessen S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit Cystein gezeigt [94]. SNC und SNALB wurden in dieser Arbeit nicht einzeln quantifiziert, sondern hämodynamische Effekte gemessen. Bei Ratten mit verminderter Albumin-Konzentration im Plasma dauerte die blutdrucksenkende Wirkung von NOC7 deutlich kürzer an als bei gesunden Ratten. Die Co-Injektion von Cystein führte zu einer verstärkten und verkürzten Blutdrucksenkung durch NOC7.

Albumin hat eine einzige Sulfhydryl-Gruppe, lokalisiert an Cys-34 [95], und ist im Plasma das Thiol mit der höchsten endogenen Konzentration von ca. 300 μM [95]. Die häufigsten niedermolekularen Thiole im Plasma sind Cystein (ca. 10 μM) und GSH (ca. 5 μM) [96]. Es ist daher denkbar, daß die Umwandlung von SNALB durch seine Reaktion mit Cystein zu SNC bzw. durch Reaktion mit GSH zu GSNO auch endogen abläuft.

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen sind nach Untersuchungen mittels Spektrophotometrie relativ schnelle und reversible Reaktionen [30,31,32]. Aufgrund der geringen Empfindlichkeit der verwendeten Analytik (s.o.), mußten diese Untersuchungen bei unphysiologisch hohen Konzentrationen der S-Nitroso-Substanzen durchgeführt werden. Bei einigen Experimenten mußte zusätzlich SNC mit Cu^{2+} entfernt werden, um die Konzentration der anderen S-Nitroso-Substanz bestimmen zu können. Die zu bestimmende S-Nitroso-Substanz kann bei der Entfernung von SNC allerdings selbst z.T. mit Cu^{2+} reagieren. Ferner konnten nur S-Transnitrosylierungs-Reaktionen erforscht werden, an denen lediglich zwei S-Nitroso-Substanzen beteiligt waren. Die Spektrophotometrie ist auch nicht dazu geeignet, S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in Zellsystemen zu untersuchen.

Als letztes sei die antimikrobielle Cytotoxizität von S-Nitroso-Substanzen genannt. Diese Eigenschaft ist schon seit mehr als 10 Jahren bekannt [97]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, daß die Salmonellen-Art *Salmonella typhimurium* einen spezifischen Metabolismus-Weg entwickelt hat, um durch die Hochregulation der Homocystein-Produktion eine Protektion gegen S-Nitroso-Substanzen zu erreichen [98]. Es ist ebenfalls bekannt, daß S-Nitroso-Substanzen wie GSNO eine Apoptose hervorrufen können [99].

1.5 Endogenes Vorkommen und Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen

Großes Interesse an S-Nitroso-Substanzen entstand durch die Entdeckung, daß sie natürlich im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten vorkommen. So wurde endogenes GSNO zuerst in Atemwegen von gesunden Menschen in einer Konzentration von 250 nM entdeckt [100]. Die GSNO-Konzentrationen waren bei Patienten mit Lungenentzündung deutlich höher (4 μM) und bei Patienten mit Asthma sehr niedrig (65 nM) [84]. Im Gehirn-Gewebe von Ratten konnte GSNO ebenfalls gemessen werden [49,101].

Die Arbeitsgruppe von Stamler publizierte zunächst Plasma-SNALB-Konzentrationen von $7 \pm 5 \mu\text{M}$ [6]. Nach neueren Angaben von Stamler (1997) beträgt die Konzentration von SNALB in Plasma, das 2-3 Wochen gelagert wurde, nur 0,25-1 μM . Die SNALB-Konzentration in frischem Plasma soll jedoch höher sein (persönliche Mitteilung an Butler und Rhodes in [64]). Untersuchungen im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Diplomarbeit [59] an gesunden Probanden zeigten, daß SNALB in frischem Plasma höchstens in Konzentrationen um 200 nM vorliegt. Seit der Entdeckung von SNALB in Plasma im Jahre 1992 erschienen keine weiteren Publikationen über die Existenz von endogenem SNALB oder seine Bildung *in vivo* mit Ausnahme von denen, die auf eigene Arbeiten zurückgehen [61].

SNC wurde im Plasma von Gesunden in der Größenordnung von 300 nM [64] gemessen, wobei einige Plasma-Proben überhaupt keine S-Nitroso-Substanzen enthielten. GSNO wurde von Leone [64] im Human-Plasma in Konzentrationen von 120-180 nM mit Hilfe einer auf der HPLC basierenden Methode gemessen. In Erythrozyten wurde S-Nitroso-Hämoglobin (SNHb) von Stamlers Arbeitsgruppe gemessen [102]. Die SNHb-Konzentrationen betrugen 300 nM in Erythrozyten aus arteriellem Blut und nur 30 nM in Erythrozyten aus venösem Blut. Es wurde die Annahme formuliert, daß Hämoglobin in der Lunge S-nitrosyliert wird, und zwar entweder durch Reaktion mit NO, das aus S-Nitroso-Substanzen wie GSNO gebildet wurde, oder durch S-Transnitrosylierung mit S-Nitroso-Substanzen.

Die Reaktion von NO mit Hämoglobin zu SNHb findet nach dieser Annahme zunächst unter Bildung von Eisen-Nitrosylhämoglobin statt, das durch seine Oxygenierung eine allosterische Änderung erfährt. Diese führt schließlich zur Umwandlung zu SNHb [103]. Während des Durchgangs der Erythrozyten von den arteriellen in die venösen Blutgefäße führt die erneute Konformations-Änderung am SNHb durch Übergang in die deoxygenierte Form zur S-Transnitrosylierungs-Reaktion von SNHb mit GSH. Der Zerfall des bei dieser Reaktion gebildeten GSNO führt dann seinerseits zur Freisetzung von NO (Abb. 3).

SNHb könnte aus dem folgenden Grunde eine besonders wichtige Rolle als physiologisch vorkommender Vasodilatator zukommen: Mit Hilfe eines Computer-Programms wurde von Lancaster die Diffusion von NO vom Entstehungsort der endothelialen NO-Synthase zum Zielort der glatten Gefäßmuskelzelle mit der Grundlage des zweiten Fick'schen Diffusionsgesetzes simuliert. Es stellte sich dabei heraus, daß das meiste NO durch Reaktion mit Hämoglobin (zu Methämoglobin) abgefangen würde [104]. Wenn lokal in den Gefäßen gebildetes

NO nicht allein verantwortlich für die Vasodilatation sein kann, so würde dem SNHb als zusätzliche NO-Quelle eine entscheidende Bedeutung zukommen. Als eine mögliche Lösung des Problems des NO-Abfangs durch Hämoglobin wird diskutiert, daß nicht freies NO, sondern NO in gebundener Form (z.B. als S-Nitroso-Substanz oder Eisen-Nitrosyl) das Produkt der NO-Synthase ist. So würde der Abfang von EDRF durch Hämoglobin nur eingeschränkt stattfinden.

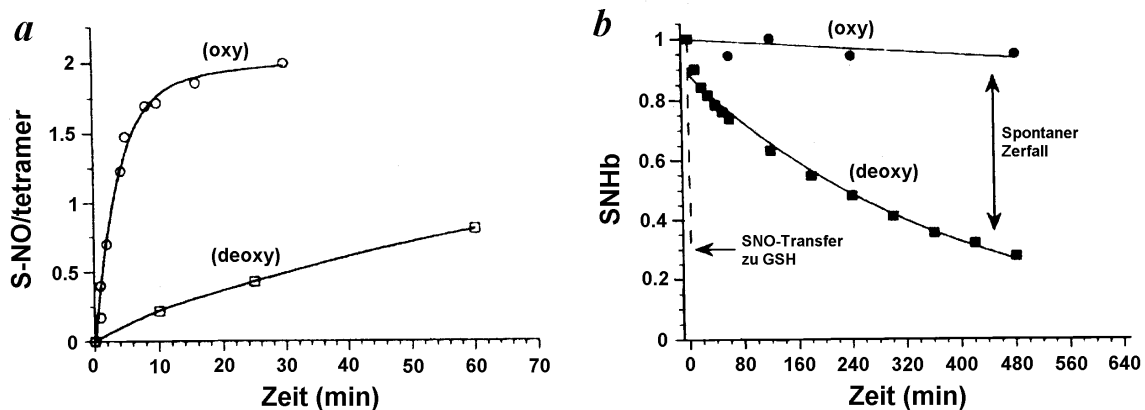


Abb. 3. Allosterische Funktion von O₂ in der Regulation der S-Nitrosylierung von Hämoglobin nach Stamler *et al.* [102] (a) Oxygenierung verstärkt die S-Nitrosylierung von Hb. Die Raten der S-Nitrosylierung durch SNC sind in der oxy-Konformation des Hb (Hb[Fe^{II}]O₂) schneller als in der deoxy-Konformation (Hb[Fe^{II}]). (b) Deoxygenierung verstärkt die Denitrosylierung von SNHb. Die Raten des RSNO-Zerfalls (und des Transfers) sind in der deoxy-Konformation (SNHb[Fe^{II}]) schneller als in der oxy-Konformation (SNHb[Fe^{II}]O₂). Der Zerfall von SNHb[Fe^{II}] wird in der Gegenwart von GSH weiter verstärkt. Während der Tot-Zeit des Experimentes (ca. 15 s) wurde bereits die Hauptmenge an SNHb[Fe^{II}] in GSNO umgewandelt (gestrichelte Linie).

In der Tat wurde berichtet, daß EDRF nicht NO, sondern SNC sein könnte [105]. Diese Vermutung beruht auf der Beobachtung, daß die vasodilatatorischen Eigenschaften von EDRF eher denen von SNC als von NO entsprechen. Ein Beweis für die Identität von SNC und EDRF ist allerdings sehr schwierig, da SNC ausgesprochen instabil ist und schnell unter NO-Freisetzung zerfällt. Auch von GSNO wurde kürzlich berichtet, daß es ein Produkt der NO-Synthase ist [14]. Es wird in dieser Publikation davon ausgegangen, daß GSNO als sekundäres Reaktionsprodukt der NO-Synthase gebildet wird, und zwar aus GSH und Peroxynitrit. Daß aus Peroxynitrit, das aus den NO-Synthase-Produkten NO und O₂⁻ entsteht, in Gegenwart von Thiolen S-Nitroso-Substanzen gebildet werden können, wurde auch von Schmidt *et al.* gezeigt [13]. In dieser Arbeit wurde GSNO allerdings nur als ein Nebenprodukt

der NOS beschrieben. Seine Bildung betrug nur 5 % des gleichzeitig aus Arginin gebildeten Citrullins. In der Arbeit von Mayer *et al.* waren es hingegen etwa 30 % [14].

Heute gilt als weitgehend akzeptiert, daß freies NO die Spezies ist, die die sGC aktiviert [64]. Dennoch ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die NOS eine S-Nitroso-Substanz produziert, die erst am Wirkort NO freisetzt und die sGC aktiviert. Ferner könnte NO⁺ von einem zellulären Thiol zum nächsten „weitergereicht“ werden, bis aus der letzten auf diese Weise gebildeten S-Nitroso-Substanz durch Homolyse der S-NO-Bindung NO freigesetzt wird [106]. Das ambivalente Verhalten von S-Nitroso-Substanzen, nämlich die Neigung zur Homolyse und Heterolyse, ist möglicherweise ein Grund für ihre mannigfaltigen biologischen Wirkungen.

Erythrozyten sind verantwortlich für die Inaktivierung von NO über seine Oxidation zu Nitrat [107]. Nitrat wird über die Niere ausgeschieden. Die Bedeutung von Erythrozyten für die Metabolisierung von S-Nitroso-Substanzen ist noch nicht eingehend untersucht. Es ist bekannt, daß SNC zur S-Nitrosylierung von Hämoglobin und Bildung von SNHb führen kann [102]. In menschlichen Zellen existieren hohe intrazelluläre Konzentrationen von GSH [108]. Es stellt sich die Frage, ob extrazelluläres SNC und andere S-Nitroso-Substanzen in das Cytosol von Erythrozyten transportiert werden können. Wäre das der Fall, so müßte durch S-Transnitrosylierungs-Reaktion von intrazellulärem GSH mit SNC GSNO gebildet werden. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß SNC und GSNO in Plasma vorwiegend zu Nitrit, in vollem Blut hingegen hauptsächlich (SNC) bzw. ausschließlich (GSNO) zu Nitrat metabolisiert werden [48].

1.6 Biochemie der NO-Synthase

Die NOS ist ein Enzym, das aus einer Häm-Domäne besteht, die über ein Calmodulin bindendes Verbindungs-Peptid mit einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-ähnlichen Diflavin-Domäne verbunden ist. Die NOS ist ein großes Polypeptid (130-160 kDa). Nur NOS-Dimere sind katalytisch aktiv [109]. Wenn Ca²⁺/Calmodulin gebunden sind, transferiert das FAD der Flavoprotein-Domäne reduzierende Äquivalente von NADPH auf FMN, das dann das Häm-Eisen reduziert. Die Reduktion des Häm-Eisens führt zur Aktivierung von O₂, das wiederum zur Oxidation des Guanidino-N-Atoms von L-Arginin zu NO und Citrullin führt [110]. Diese Reaktion findet über die intermediäre Zwischenstufe N^G-Hydroxyarginin statt [111,112] (Abb. 4).

Die NOS bildet eine Familie von Enzymen, von denen drei genetisch verschlüsselte Isoformen bei Tieren identifiziert wurden [11,113,114]. Die neuronale (nNOS) und die endotheliale (eNOS) sind konstitutive NO-Synthasen mit posttranslationaler Regulation der Enzym-Aktivität. Die iNOS ist eine induzierbare Isoform, die durch bestimmte Stimuli (z.B. Cytokine) expri- miert wird. Ihre Aktivität wird hauptsächlich durch den Transcriptions-Level reguliert [115]. Unter Normalbedingungen (bei Gesunden) reguliert eNOS- und nNOS-produziertes NO den Blutdruck und den Blutfluß im Gehirn, der mit neuronaler Aktivierung assoziiert wird.

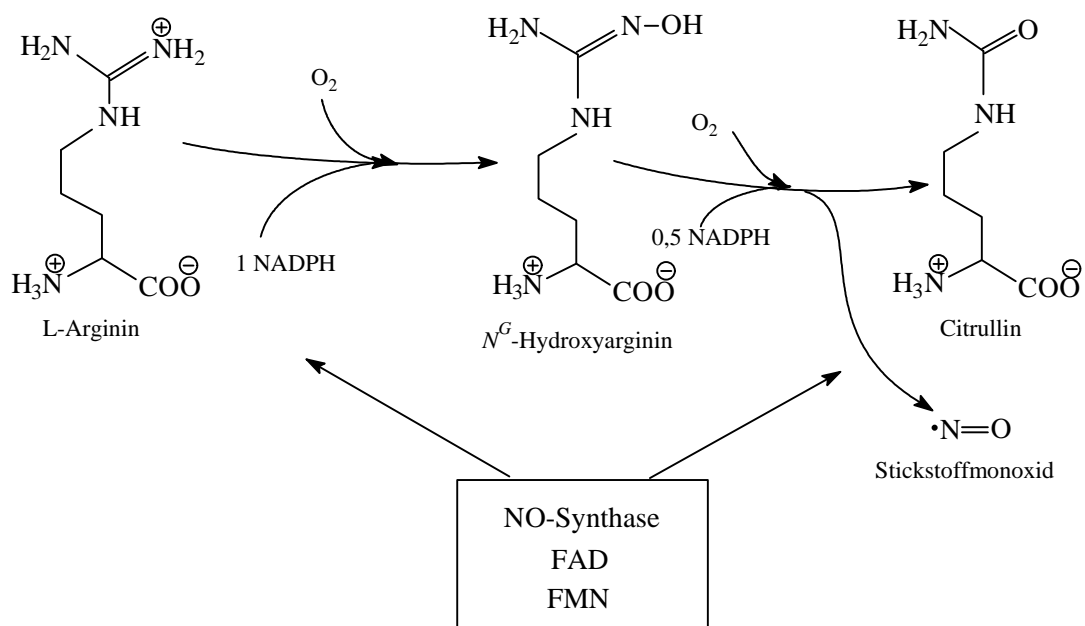


Abb. 4. NOS-katalysierte Bildung von NO aus L-Arginin. Nach [116].

Vermehrte Bildung von NO kann zu pathologischen Erscheinungen führen. NO-Überproduktion durch nNOS bzw. iNOS steht in direktem Zusammenhang mit Schlaganfällen [117] bzw. Schock und rheumatoider Arthritis [115,118].

In Studien am Cholesterin-gefütterten Kaninchen wurde gezeigt, daß Arginin-Gabe in die Nahrung zu einem Rückgang von Arteriosklerose-Symptomen, wie die Progression arteriosklerotischer Plaques oder die Akkumulation von Makrophagen in arteriosklerotische Gefäßwände, führte [119]. Die Autoren der entsprechenden Publikation haben die Arbeitshypothese, daß die positive Wirkung der oralen Gabe von L-Arginin vor allem auf die Verschiebung des Verhältnisses des Substrates L-Arginin zu asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem endogenen Inhibitor der NOS [120], zurückzuführen ist. Allein durch das gesteigerte Angebot des Substrates L-Arginin an die NOS können die gemachten Beobachtungen jedoch nicht erklärt werden: Die NOS sollte bei physiologisch im Plasma vorkommenden Konzentrationen von

L-Arginin bereits mit dem Substrat L-Arginin gesättigt sein, so daß eine Steigerung der NO-Bildungsgeschwindigkeit durch Erhöhung der L-Arginin-Konzentration nicht erreicht werden kann. Durch eine Studie an hypertensiven Patienten konnte gezeigt werden, daß diese Personen gegenüber Gesunden eine verminderte Nitrat-Ausscheidung im Urin und eine gesteigerte ADMA-Plasma-Konzentration haben [121]. Auch bei Patienten mit Arteriosklerose wurde eine Abnahme der NO-Produktion und eine Zunahme der Plasmakonzentration von ADMA in Parallelität zur Schwere der Erkrankung gefunden [122]. Die Hochregulation der eNOS könnte somit ein signifikantes Potential für die Kontrolle kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

Sowohl die iNOS als auch die nNOS sind cytosolische Enzyme, während die eNOS membrangebunden ist [123]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen wurden an isolierter nNOS durchgeführt. Alle drei Isoenzyme sind von Tetrahydrobiopterin (H_4Bip) als Cofaktor abhängig [124,125,126]. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die Rolle von H_4Bip in der NOS noch unklar [127]. Es ist heute bekannt, daß die zwei NOS-Untereinheiten unabhängig voneinander funktionieren [128] und eine Untereinheit H_4Bip stark und die andere H_4Bip schwach bindet. Aufgereinigte nNOS, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, enthält immer ≤ 1 Molekül H_4Bip pro Dimer, das bedeutet, daß je eine Untereinheit mit bzw. ohne gebundenes H_4Bip vorliegt [14]. In diesem Zustand ist das Enzym in der Lage, L-Citrullin zu produzieren. Durch Bindung von H_4Bip an die zweite Untereinheit kann die Aktivität auf das Zweifache gesteigert werden [14]. Es wurde der Schluß gezogen, daß die Untereinheit, die immer H_4Bip gebunden hat, NO produziert, während die, die kein H_4Bip trägt, Superoxid (O_2^-) produziert [14]. Die simultane Produktion von NO und Superoxid durch die NOS führt wiederum zur Bildung von Peroxynitrit.

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Peroxynitrit als auch der NO/O_2^- -Donor SIN-1 sGC aktivieren können, und zwar nur bzw. in erheblich höherem Maße in Gegenwart von GSH [14]. Inkubations-Ansätze von nNOS und L-Arginin verhielten sich genauso GSH-abhängig bezüglich der sGC-Aktivierung wie Ansätze mit SIN-1. Das ließ den Schluß zu, daß in den NOS-Ansätzen von der NOS sowohl NO als auch O_2^- produziert wurde, die mit GSH zu einer Cu^{1+} -abhängigen sGC-aktivierenden Substanz reagiert haben mußten. Analyse mittels HPLC bzw. Clark-NO-Elektrode (nach Cu^{1+} -katalysierter NO-Freisetzung) führte zum Ergebnis, daß es sich bei dieser Substanz um GSNO handelte. Dies steht allerdings im Widerspruch zu Be-

obachtungen *in vitro*, nach denen die Reaktion von GSH mit Peroxynitrit zu GSNO-Ausbeuten von maximal 1% führt [129,130]. Balazy *et al.* zeigten allerdings, daß nicht GSNO, sondern das Thionitrat S-Nitroglutathion (GSNO_2) das Produkt der Reaktion von GSH mit Peroxynitrit ist [50]. GSNO und GSNO_2 sind nur durch Massenspektrometrie unterscheidbar. Beide Substanzen sind NO-Donoren und ihre UV-Vis-Spektren sind praktisch identisch. Ferner sind sowohl GSNO als auch GSNO_2 Vasodilatoren [50].

1.7 Methoden zur Analyse der Produkte von NO-Synthase und ihrer Aktivität

Die Bestimmung der NOS-Aktivität kann über die Bildung von Citrullin aus radioaktiv markiertem L-Arginin [131,132] oder nach Konvertierung von Citrullin zum fluoreszierenden OPA-Derivat und anschließender HPLC-Analyse [133] erfolgen. Die NOS-katalysierte Bildung von NO aus L-Arginin kann über die Nitrit-Bildung nach seiner Reaktion mit GSH im Sauren zu GSNO [134], über die Bildung von NO nach Reaktion mit Vanadiumchlorid [134] oder durch Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin spektrophotometrisch bestimmt werden [54]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Aktivierung der sGC durch NO über die Bildung von cGMP zu messen [135]. Ferner kann die NOS-Aktivität über den NADPH-Verbrauch der NOS fluorometrisch bestimmt werden [136]. Auch kann der Verbrauch von Arginin und die Bildung von Citrullin mittels HPLC verfolgt werden [137].

Es existiert noch keine veröffentlichte Methode zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen als direkte oder indirekte Produkte der NOS bei gleichzeitiger Möglichkeit zur Messung der NOS-Aktivität durch die Nitrit- und/oder Nitrat-Bildung. Die bereits angesprochene GC-MS-Methode [58] bietet die Möglichkeit, eine solche Methode zu entwickeln. Sie hätte den entscheidenden Vorteil der Verwendung eines internen Standards und der Interferenz-Freiheit auch in Gegenwart von NOS-Inhibitoren wie N^G -Nitro-L-Arginin (L-NNA) [43]. Unter anderem zur Überprüfung der von Schmidt *et al.* [13] bzw. Mayer *et al.* [14] publizierten Daten über die Bildung von GSNO als Produkt der NOS wurde eine solche Methode in der vorliegenden Arbeit entwickelt und angewendet. Die in den Arbeiten von Schmidt *et al.* und Mayer *et al.* verwendeten Methoden zur GSNO-Bestimmung in NOS-Ansätzen basieren auf der HPLC-Analyse solcher Ansätze. Die hierbei verwendeten Eluenten hatten einen niedrigen pH-Wert, der zu einer artifiziellen GSNO-Bildung aus GSH und Nitrit führen kann.

2 Zielsetzung

Zentrale Anliegen der vorliegenden Dissertation waren, die NOS-katalysierte Bildung von S-Nitroso-Substanzen *in vitro* und insbesondere die Bedeutung der S-Transnitrosylierungs-Reaktion für den Transport, Metabolismus und die Entfaltung der biologischen Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen und NO zu untersuchen.

Die Realisierung dieser Ziele erforderte den Einsatz zuverlässiger, hochspezifischer, Interferenz-freier und sensitiver analytischer Methoden. Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit war daher, quantitative analytische Methoden zu entwickeln, zu validieren und ihre Anwendbarkeit nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zu testen. Da die GC-MS-Technologie die oben genannten Voraussetzungen in hohem Maße erfüllt, sollte diese Technologie die Basis für die zu entwickelnden analytischen Verfahren sein. Als ergänzende bzw. alternative Technologie sollte die HPLC dienen.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von größtmöglicher Reinheit.

Adenosindiphosphat (ADP)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Aceton	Baker, Holland
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>N</i> -Acetyl-L-cystein (NAC)	Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>N</i> -Acetyl-DL-penicillamin (NAP)	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumsulfamat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L-Arginin	Fresenius
L-[¹⁵ N ₂]Arginin (98 Atom % für beide ¹⁵ N-Guanidino-Atome)	Cambridge Isotope Laboratories Andover, MA, USA
Ascorbinsäure	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bathocuproinsulfonat	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Butylnitrit, 95%	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3-dicarbonsäure (DTNB)	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cadmiumpulver, 100 mesh, 99,5%	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calmodulin (CaM)	Biomol, Hamburg, Deutschland
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cystin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
[¹⁴ C]Cystin (10,8 GBq/mmol)	NEN, Köln, Deutschland
DETA NONOat	Alexis, Grünberg, Deutschland
<i>N</i> ^G , <i>N</i> ^{G'} -Dimethylarginin (Symmetrisches Dimethylarginin, SDMA)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
<i>N</i> ^G , <i>N</i> ^G -Dimethylarginin (Asymmetrisches Dimethylarginin, ADMA)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Aldrich, Steinheim, Deutschland
1,4-Dithio-DL-threitol	Fluka, Deutschland
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	Baker, Holland
<i>N</i> – Ethyldiisopropylamin	Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>N</i> – Ethylmaleimide	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Flavinadenindinucleotid (FAD)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Flavinadeninmononucleotid (FMN)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glutathion, oxidierte Form (GSSG)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glyceroltrinitrat (GTN), 2,2 Gew.% in Glucose	Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt, Deutschland
Human-Serumalbumin (HSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DL-Homocystein	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung (0,9%)	Braun, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrat	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland
Natrium[¹⁵ N]nitrat, (98,5% ¹⁵ N)	MSD Isotopes MFC, Montreal, Canada
Natrium[¹⁵ N]nitrit, (98,5% ¹⁵ N)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
Natriumnitrit	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Tetraborat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
N-Ethylmaleimid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Nicotinamadenindinucleotidphosphat (NADPH)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
N ^G -Nitro-L-Arginin (L-NNA)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Nitronium-Tetrafluoroborat	Aldrich, Steinheim, Deutschland
NO-Gas	Linde, Hannover, Deutschland
N ^G - Methyl-L-Arginin (L-NMA)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz	Aldrich, Steinheim, Deutschland
ODQ	Alexis, San Diego, USA
2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pentafluoropropionsäureanhydrid	Pierce, Rockford, Illinois, USA
<i>o</i> -Phosphorsäure 85%	Aldrich Chemie, Deutschland
<i>o</i> -Phthaldialdehyd	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Quecksilber(II)-chlorid	Aldrich Chemie, Deutschland
Rotiszint ecoplus	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, konz.	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>S</i> -Nitroso- <i>N</i> -acetyl-penicillamin (SNAP)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Stickstoffmonoxid (NO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sulfanilsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetrahydrobiopterin (H ₄ Bip)	Dr. B. Schricks Lab., Jona, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dest. Wasser (Ampuva für Spülzwecke)	Fresenius
Zink	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Für die GC-MS verwendete Gase:	
Helium (5,0), Methan (5,5) und Argon (5,0)	Linde, Hannover, Deutschland

3.2 Reagenz-Lösungen

OPA-Reagenz A

36,4 mM OPA, 90 Vol% 75 mM Borat-Puffer (pH 8,0), 10 Vol% Ethanol.

OPA-Reagenz B

36,4 mM OPA, 90 Vol% 75 mM Borat-Puffer (pH 8,0), 10 Vol% Ethanol, 12,2 mM 2-Mercaptoethanol.

OPA-Reagenz C

36,4 mM OPA, 90 Vol% 75 mM Borat-Puffer (pH 8,0), 10 Vol% Ethanol, 12,2 mM NAC.

Griess-Reagenz A

37,5 mM Sulfanilsäure in dest. Wasser.

Griess-Reagenz B

12,5 mM N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid in dest. Wasser.

Saville-Reagenz A

100 mg HgCl_2 + 1,36 g Sulfanilsäure in 50 ml 0,5 N HCl.

Saville-Reagenz B

50 mg N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid in 50 ml 0,5 N HCl.

Bradford-Reagenz

10 mg Coomassie Brilliant Blue wurden in 4,7 Ethanol gelöst, 10 konz. H_3PO_4 zugegeben und gemischt. Unter Rühren wurden 100 ml dest. Wasser zugegeben und nach 10 min filtriert. Das Reagenz wurde vor Licht geschützt und für maximal 4 Wochen benutzt.

Ellman-Reagenz

5 mM Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3-dicarbonsäure in dest. Wasser.

3.3 Pufferlösungen

Die pH-Wert-Einstellung erfolgte wahlweise mit *o*-Phosphorsäure oder NaOH. Zur Herstellung wurde destilliertes Wasser verwendet.

Puffer A (Startpuffer zur Äquilibration und zum Spülen von HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen für die Extraktion von Albumin)

50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0

Puffer B (Elutionspuffer zur Extraktion von Albumin und SNALB)

50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0, 1,5 M KCl

Puffer C (Für Thiolbestimmung nach Ellman)

100 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0

Puffer D (Boratpuffer, pH 8)

75 mM Natriumborat, pH 8,0

Puffer F (0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4)

200 mM Tris – HCl, pH 7,4

3.4 HPLC-Eluenten

Vor Benutzung wurden die Eluenten mit Stickstoff 10 min begast.

Eluent A (für S-Nitroso-Substanzen)

15 Vol% Acetonitril, 85 Vol% Wasser, 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Octan-1-sulfonsäure Natrium-salz, pH 2,0.

Eluent B (für Arginin)

25 Vol.% Acetonitril, 75 Vol% Wasser, 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz, pH 2,0.

Eluent C (für GSNO nach Derivatisierung mit OPA, Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Derivatisierung)

20 Vol.% Acetonitril, 80 Vol% Wasser, 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Octan-1-sulfonsäure Natriumsalz, pH 2,0.

Eluent D (für GSNO nach Derivatisierung mit OPA zur Isolierung von underivatisiertem GSNO (auch aus NO-Synthase-Inkubations-Ansätzen) und zur Analyse der GSH-OPA-Derivate)

7,5 Vol% Methanol, 92,5 Vol% 150 mM Natrium-Acetat, pH 7.

Eluent E (für GSNO nach Derivatisierung mit OPA, zur Trennung von OPA-Derivaten für massenspektrometrische Analysen und zur Analyse von GSNO (nach Derivatisierung mit OPA) in wässrigen Lösungen)

7,5 Vol% Methanol, 92,5 Vol% 150 mM Ammonium-Acetat, pH 7.

3.5 Biologisches Probenmaterial, Versuchstiere

Menschliche Blutproben wurden von freiwilligen Probanden und von Blutspendern der Blutbank der MHH erhalten.

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten aus dem Zentralen Tierlabor der MHH verwendet.

3.6 Geräte**Photometer**

Ultrospec II UV/Visible Spektrometer	LKB Biochrom, Freiburg
--------------------------------------	------------------------

UV-VIS-Spektrometer

U-2000-Spectrophotometer	Hitachi
--------------------------	---------

Liquid Scintillation Counter

1211 Rackbeta und Counter-Drucker	LKB Wallac
-----------------------------------	------------

Aggregationssystem

Aggregometer Labor und Printer – Plotter	Apact
Dispo – System Micro (Küvetten mit Mixer)	Laborgeräte und Analysensysteme
Hardware	Atari
Software: Programm Laboraggregation	Hoechst

Zentrifugen:

Biofuge 15	Heraeus Sepatech, Deutschland
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall Instruments DuPont, Bad Homburg, Deutschland
Kühlzentrifuge K2S	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge CR 412	Jouan, Deutschland

3.7 Weitere Materialien

Autosampler, Microeinsätze	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehn, Deutschland
Bluecap 50ml	Greiner, Fichtenhausen, Deutschland
Citrat-Monovetten, S-Monovetten 9NC, 5 ml	Sarstedt, Deutschland
EDTA-Monovetten, KE, 3 bzw. 9 ml	Sarstedt, Deutschland
Cuvetten(10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Deutschland
Evaporator, TurbovapLV	Zymark,USA
Hi-Trap-Blue affinity columns (1 und 5 ml)	Pharmacia-Biotech, Freiburg, Deutschland
Magnetrührer, HI 190 M	Hanna Instruments, Deutschland
Multiadapter	Sarstedt, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Deutschland
Polypropylenröhrchen, 10 ml, 4 ml	Greiner, Fichtenhausen, Deutschland
Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke)	Jürgens, Deutschland
Sephadex-PD10-Columns	Pharmacia-Biotech, Freiburg, Deutschland
microcon SCX-Kartuschen	Amicon. Beverly, MA, USA
Thermoblock, Bioblock Scientific Code 92675	Thermolyne Corp., USA
Thermostat 5320	Eppendorf,Deutschland
Ultrafiltrations-Kartuschen, 20.000 Da	Sartorius, Göttingen
Varipetten 10,100,1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Vortexer, Reax 200	Heidolph, Deutschland

Verwendete HPLC- und GC-MS-Geräte werden zusammen mit den entsprechenden Methoden beschrieben.

4 Methoden

4.1 Literatur-Methoden

4.1.1 Bestimmung von Nitrit nach Griess [56]

Zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Urin, Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten wird häufig die Methode von Griess verwendet [56]. Die Griess-Methode verläuft in einer biologischen Flüssigkeit nicht Interferenz-frei, da freie reduzierte Thiole, Proteine und andere Plasmabestandteile die Messung beeinflussen können [43]. In dieser Arbeit wurde diese Methode ausschließlich für die Bestimmung von Nitrit in wäßrigen, gepufferten Lösungen eingesetzt.

Ein 1 ml-Aliquot der Probe wurde mit 100 µl Griess-Reagenz A und 100 µl 5N HCl versetzt. Nach 2 min gibt man 100 µl Griess-Reagenz B hinzu und mißt nach weiteren 10 min die Absorption bei 540 nm. Auftragung der Extinktion (y) gegen die zugesetzte Nitrit-Konzentration

(0-10 μM , in Puffer A) (x) und lineare Regression ergab die folgende Geradengleichung: $y = 0,0029 + 0,0163 x$, $r = 0,995$.

4.1.2 Messung von Nitrit und S-Nitroso-Substanzen nach Saville [57]

Ein 1 ml-Aliquot der Probe wurde mit 100 μl Saville-Reagenz A und mit 100 μl Saville-Reagenz B versetzt und nach 10 min die Absorption bei 540 nm gemessen. Auftragung der Extinktion (y) gegen die zugesetzte SNC-Konzentration (0-10 μM , in Puffer A) (x) und lineare Regression ergab die folgende Geradengleichung: $y = 0,0156 + 0,0137 x$, $r = 0,990$.

4.1.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford [138]

Ein 50 μl -Aliquot der Probe wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und nach 10 min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Es wurde eine Kalibrierkurve im Bereich von 0-1 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA) in Puffer A aufgenommen. Auftragung der Extinktion (y) gegen die zugesetzte HSA-Konzentration (x) und polynomische Regression ergab die folgende Gleichung: $y = -0,995 x^2 + 2,151 x + 0,021$, $r = 0,999$.

4.1.4 Bestimmung von Thiolgruppen nach Ellman [139]

Ein 300 μl -Aliquot der Probe wurde mit 500 μl Wasser verdünnt und anschließend mit 200 μl Puffer E sowie 10 μl Ellman-Reagenz versetzt. Auftragung der Extinktion (y) gegen die zugesetzte GSH-Konzentration (0-100 μM in Puffer A) (x) und lineare Regression ergab die folgende Geradengleichung: $y = -0,0004 + 0,0042 x$; $r = 1,000$. Diese Methode wurde zur Bestimmung der Gesamtheit von Plasma-Thiolen (Albumin + niedermolekulare (*low molecular weight*, LMW) Thiole) verwendet.

4.1.5 Bestimmung von Cu^{2+} mittels Bathocuproinsulfonat [140]

Ein 1000 μl -Aliquot einer Probe wurde mit einer kleinen Spatelspitze Ascorbinsäure versetzt. Nach kurzem Vortex-Mischen wurden 100 μl einer 10 mM Bathocuproinsulfonat-Lösung zugesetzt und nach 5 min Inkubation die Extinktion bei 485 nm gemessen. Auftragung der Extinktion (y) gegen die zugesetzte Cu^{2+} -Konzentration (0-10 μM) (x) und lineare Regression ergab die folgende Geradengleichung: $y = -0,0032 + 0,0099 x$; $r = 0,995$.

4.1.6 Messung von NO in gepufferten wäßrigen Lösungen

NO wurde in gepufferten wäßrigen Lösungen mit einem *ISO-NO-meter*, ausgestattet mit einem *200 µm diameter shielded microsensor* ISO-NOP200 und einem an einen PC angeschlossenen *Duo-18 data recording system* (World Precision Instruments, Sarasota, FL), gemessen. Die NO-Elektrode wurde in 1 ml-Aliquots der verwendeten Puffer-Lösung eingetaucht, die sich in 1,5 ml-Glas-Gefäßen befanden und mittels Magnetrührer gerührt (300 min^{-1}) wurden.

NO und die zu untersuchenden NO-Donatoren wurden mit einer 20 µl-Hamilton-Spritze in Form wäßriger Lösungen zugesetzt, sobald eine konstante Spannung an der Elektrode anlag. Die Kalibrierung der NO-Elektrode erfolgte mit einer gesättigten NO-Lösung (ca. 2 mM) in entgastem dest. Wasser. Auftragung des erhaltenen Spannungsanstiegs (in mV) nach NO-Zugabe (y) gegen die zugesetzte NO-Konzentration (0-100 µM) (x) ergab nach linearer Regression folgende Geradengleichung: $y = 42,232 + 94,44 x$, $r = 0,995$.

4.1.7 Reduktion von Nitrat zu Nitrit

Zur Bestimmung von Nitrat als PFB-NO₂ ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit erforderlich. Diese Reduktion kann sowohl im sauren als auch im alkalischen Milieu durchgeführt werden. Die im folgenden beschriebenen Prozeduren sind für die Bestimmung mittels GC-MS vorgesehen. Die Reduktion unter alkalischen Bedingungen liefert zuverlässigere Ergebnisse bei der GC-MS-Analyse. Sie hat jedoch die Nachteile, daß S-Nitroso-Substanzen (wie sogar das relativ stabile GSNO) bei der Reduktion mit Cadmium in alkalischer Lösung zu Nitrat beitragen [65] und daß die Proben 1:10 verdünnt werden müssen.

Vor kurzem wurde entdeckt, daß Nitrat auch ohne vorherige Reduktion zu Nitrit mit PFB-Br reagiert (unveröffentlichte Ergebnisse). In Analogie zur Reaktion von Nitrit mit PFB-Br zu PFB-NO₂ reagiert Nitrat zu PFB-ONO₂. Die Ausbeute dieses PFB-Derivates ist erheblich niedriger als die des PFB-NO₂, ist aber ausreichend für die Quantifizierung von Nitrat in biologischen Flüssigkeiten. Nitrit und Nitrat können unter Verwendung der entsprechenden ¹⁵N-markierten internen Standards simultan mittels GC-MS bestimmt werden. Diese Methode kam in einigen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Die Derivatisierungs-Bedingungen gleichen denen der Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS.

4.1.7.1 Reduktion in saurer Lösung

Ein 100 µl-Aliquot der Probe wurde [^{15}N]Nitrat als interner Standard zugesetzt, 900 µl essigsaures dest. Wasser, pH 5, und 10 mg Cd-Pulver zugegeben. Unter ständigem Schütteln erfolgte eine Inkubation für 90 min bei RT. Anschließend wurde bei 1200 g für 5 min zentrifugiert und ein 100 µl-Aliquot des Cd-freien Überstandes abgenommen. Das entstandene Nitrit wurde wie unter 4.1.8 beschrieben derivatisiert. Nach der Entfernung des Acetons aus den Reaktionsgemischen wurden sie mit 900 µl Toluol (anstatt 300 µl) extrahiert.

4.1.7.2 Reduktion in alkalischer Lösung

Ein 100 µl-Aliquot der Probe, versetzt mit [^{15}N]Nitrat als interner Standard, wurde mit 900 µl 5%igem Ammoniumchloridpuffer (pH 8,8) aufgenommen, mit 10 mg Cadmium versetzt und 90 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 1200 g für 5 min erfolgte das Abnehmen des Überstandes und die Weiterbehandlung nach 4.1.8.

4.1.8 GC-MS-Bestimmung von Nitrit und Nitrat

100 µl-Aliquots der zu untersuchenden Probe wurden mit 400 µl Aceton und 10 µl PFB-Bromid versetzt und für 1 h bei 47-50°C inkubiert. Dann wurde die Probe auf ein Volumen von ca. 100 µl im Stickstoffstrom eingengt und der wäßrige Rückstand für 1 min mit 300 µl (für Nitrit) bzw. 600 µl (für Nitrat) Toluol extrahiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert. 100 µl-Aliquots der Toluol-Phase wurden in ein sauberes Autosampler-Glas mit Microeinsatz pipettiert.

Für die GC-MS-Analysen wurde ein Gaschromatograph 5890 series II (Waldbronn, Deutschland) eingesetzt. In ihm befand sich eine Kapillarsäule vom Typ DB-5 MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) von J. & W. Scientific (Rancho Cordova, CA). Helium (70 kPa) diente als Trägergas. Das folgende Ofentemperaturprogramm für die GC-Säule wurde verwendet: 2 min bei 70°C, dann Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 5°C/min auf 100°C, gefolgt von einer Rate von 30°C/min auf 310°C.

Der Gaschromatograph war gekoppelt mit einem Massenspektrometer von Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland) (MS Engine 5890A). Als Ionisierungsgas diente Methan (200 Pa) unter NICI (*negative ion chemical ionization*) -Bedingungen. Konstante Temperaturen von 180, 280 und 200°C wurden an Ionenquelle, Interface und Injektor gehalten. Die Elektronen-

energie und der Elektronenstrom wurden bei 230 eV und 300 μA eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl im splitless-Modus.

Die Fragmente mit der höchsten Intensität in den NICI Massenspektren von PFB- NO_2 bzw. PFB- $^{15}\text{NO}_2$ waren m/z 46 (Nitrit) bzw. m/z 47 [^{15}N]Nitrit. Weniger intensive Ionen wurden bei m/z 226 ([PFB- NO_2 -1] $^-$) und m/z 227 ([PFB- $^{15}\text{NO}_2$ -1] $^-$) gemessen. Das Peakflächenverhältnis von m/z 47 zu m/z 46 im SIM (*selected ion monitoring*) von 1 nmol PFB- NO_2 betrug $0,00456 \pm 0,00013$ (Mittelwert \pm SD, $n = 5$) mit einer RSD von 2,9 %. Das Peakflächenverhältnis von m/z 46 zu m/z 47 im SIM von 1 nmol PFB- $^{15}\text{NO}_2$ betrug $0,02868 \pm 0,00026$ (Mittelwert \pm SD, $n = 5$) mit einer RSD von 0,9 %. Der höhere Wert des Peakflächenverhältnisses von m/z 46 zu m/z 47 von PFB- $^{15}\text{NO}_2$ im Vergleich zu dem von m/z 47 zu m/z 46 von PFB- NO_2 kann mit der Präsenz von [^{14}N]Nitrit im internen Standard und in den anderen verwendeten Reagenzien erklärt werden. Das Peakflächenverhältnis von m/z 46 zu m/z 47 im SIM, gemessen in einer Mischung von je 0,54 nmol PFB- NO_2 und PFB- $^{15}\text{NO}_2$, wurde zu $1,0310 \pm 0,0025$ (Mittelwert \pm SD, $n = 5$) mit einer RSD von 0,2 % bestimmt.

Die Anfertigung einer Standardkurve in 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, im Bereich von 0-1000 nM Nitrit und Auftragung der gemessenen (y) gegen die eingesetzten (x) Nitrit-Konzentrationen führte nach linearer Regressions-Analyse zur folgenden Geradengleichung: $y = 9,73 + 1,009 x$, $r^2 = 0,995$. Als interner Standard wurde hier 500 nM [^{15}N]Nitrit verwendet. Weitere analytische Daten zur Bestimmung von Nitrit mittels GC-MS sind in Kapitel 4.2.5.1 zu finden.

Eine Standardkurve für Nitrat (0-4000 μM) in 5 Gew%igem Ammoniumchlorid-Puffer, pH 8,8, (Reduktion im Alkalischen) wurde angefertigt. Als interner Standard wurde 800 μM [^{15}N]Nitrat verwendet. Die Auftragung der gemessenen (y) gegen die zum Puffer zugegebenen Nitrat-Konzentrationen (x) und lineare Regression führte zur Geradengleichung: $y = 39,7 + 1,007 x$, $r^2 = 0,997$. Der relativ hohe Wert des y-Achsenabschnittes kommt durch die Verdünnung der Proben für die Reduktion zustande.

4.1.9 Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS wurde überwiegend eingesetzt, um die Struktur intakter synthetischer und biologischer S-Nitroso-Substanzen aufzuklären. ESI-MS wurde ebenfalls eingesetzt, um die Struktur der Reaktionsprodukte von GSH und OPA aufzuklären.

ESI-MS-Analysen wurden mit einem API III+ (PE-SCIEX, Langen, Deutschland) durchgeführt, der mit einer Ionen-Spray-Ionisierungs-Quelle ausgestattet war. Das Instrument wurde täglich mit Polypropylen-Glycol-Standard kalibriert. Die HPLC-Eluate von OPA-Derivaten von S-Nitroso-Substanzen wurden mit 2 Vol%iger Ameisensäure in Acetonitril (1:1, V:V) versetzt und direkt analysiert. GSNO aus Erythrozyten wurde nach Extraktion der ultrafiltrierten Cytosol-Fractionen mittels SCX-Kartuschen mittels ESI-MS analysiert. Die molekularen Massen der OPA-Derivate wurden im positiv-Ionen-Modus durch Fluß-Injektion bei 5 µl/min bestimmt. Die *orifice*-Spannung betrug 40-50 V. Mindestens 10 scans wurden aufgenommen und integriert.

Tandem-Quadrupol-Massenspektrometrie wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Eltern-Ionen $[M+H]^+$ (für GSNO und GS¹⁵NO) wurden für die Tandem-massenspektrometrischen Analysen verwendet. Argon wurde dabei als Kollisions-Gas eingesetzt. Kollisions-Energie und Kollisions-Gas-Dichte wurden während des Experiments zum Erhalt von gleichen Intensitäten aller Fragmente optimiert. Etwa 10 Scans wurden aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm MacSpec (PE-SCIEX, Langen, Deutschland) ausgewertet.

4.1.10 Extraktion von Proteinen mit Sephadex-PD 10-Säulen

Nach Äquilibration der Sephadex-PD 10-Säulen mit 25 ml der Lösung, in der das zu extrahierende Protein vorliegen sollte, wurde die Probe mit dem zu extrahierenden Protein (2,5 ml) auf die Säule gegeben. Anschließend wurden 3,5 ml der gewünschten Lösung auf die Säule gegeben und das Eluat vollständig aufgefangen.

4.1.11 Extraktion von GSNO mit microcon-SCX-Kartuschen

Die Vorkonditionierung erfolgte mit 200 µl MeOH. Anschließend wurde mit 500 µl dest. Wasser gewaschen. Ein 200 µl-Aliquot der Probe wurde aufgegeben und die Kartusche mit 500 µl 10 mM HCl gespült. Zur Elution wurden 60 µl 1 M Ammoniumacetat, pH 7,0

verwendet. Zur Aufgabe der einzelnen Lösungen wurde die Kartusche bei 4000 min^{-1} an der Heraeus-Biofuge zentrifugiert.

4.1.12 Messung der Plättchenaggregation

Die Messungen der Plättchenaggregation wurden nach einer Methode von Born und Cross [141] durchgeführt. Bei dieser Methode führt die Aggregatbildung in plättchenreichem Plasma (PRP) oder in geeigneten Puffersystemen, in denen sich gewaschene Thrombozyten befinden, zu einer Abnahme der Trübung. Mit Hilfe des Aggregometers kann dieser Vorgang registriert werden. Dabei wird die Änderung der Lichttransmission im PRP oder in Suspension von gewaschenen Plättchen gemessen. Anhand der Aggregometerkurven kann die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Thrombozytenaggregation ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich PRP verwendet.

Zur Auswertung der gemessenen Werte wurde die gemessene maximale Aggregation auf 100 % gesetzt und dem entsprechend die maximale Inhibition auf 0 %. Das Probenvolumen betrug bei allen Aggregations-Messungen 250 μl . Die Aggregation wurde durch Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP, 1, 2 oder 4 μM im PRP) gestartet und die Aggregation über 5 min aufgenommen. Erfolgte die Aggregations-Messung in Gegenwart von Cystein (10 μM im PRP), so wurde dies 3 min vor der ADP-Zugabe zur Probe gegeben. Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma wurden 30 ml frisch gewonnenes Blut mit Citrat als Anticoagulant für 15 min bei 200 g zentrifugiert.

4.1.13 HPLC

Sämtliche HPLC-Analysen wurden mit einem HPLC Pump System, Model 2150, von LKB (Bromma, Schweden) durchgeführt. Die Trennsäule (250 x 4,6 mm I.D.) war entweder mit ODS Hypersil Shandon, England) oder mit Nucleosil 5-100 C₁₈ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gepackt. Beide Materialien hatten eine Partikelgröße von 5 μM . Der Effluent wurde mit einem UV-Vis Spektrometer von LDC Analytical (Gelnhausen, Deutschland), Modell 1204, detektiert. Die Auswertung des Meß-Signals erfolgte durch einen Shimadzu-Integrator, Modell C-R3A (Kyoto, Japan) (HPLC-System A). Für die Bestimmung von GSNO als OPA-Derivat wurde zusätzlich ein in Reihe geschalteter Fluoreszenz-Detektor Spektrofluor, Modell JY3 D von Jobin, Yvon, Frankreich, verwendet (HPLC-System B).

Als mobile Phase dienten die im Materialien- und Chemikalien-Teil angegebenen Eluenten A bis E. Isokratische Läufe wurden bei einer Flußrate von 1-1,4 ml/min durchgeführt.

4.1.13.1 HPLC-System A

Es wurde bei einer Wellenlänge von 333 nm zur Analyse von S-Nitroso-Substanzen gearbeitet. Zur direkten Analyse von oxidierten und reduzierten Thiolen und Aminosäuren wurde bei einer Wellenlänge von 205 nm gemessen.

Bei Verwendung des am häufigsten benutzten Eluenten A für S-Nitroso-Substanzen, der ODS-Hypersil-Säule und einer Flußrate von 1 ml/min wurden für in 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, befindliche S-Nitroso-Substanzen folgende Retentionszeiten (als Mittelwert in min \pm SD, n = 6) gemessen: SNAC: $4,42 \pm 0,03$, SNC: $5,94 \pm 0,05$ und $6,6 \pm 0,03$ (Doppelpeak), GSNO: $13,4 \pm 0,1$ und SNAP: $16,56 \pm 0,12$. Lineare Regression zwischen Peakfläche und Konzentration führte bei diesen Substanzen zu Regressions-Koeffizienten von $r^2 \geq 0,981$. Das *limit of detection* (LOD) der Methode (Signal-zu-Rausch-Verhältnis 3:1) in Tris-Puffer betrug für SNAC 0,3 μ M, für SNC 1 μ M, für GSNO und für SNAP jeweils 0,5 μ M. Abb. 5 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm einer Analyse eines ternären Gemisches aus S-Nitroso-Substanzen und ihren korrespondierenden Thiolen bei 333 nm.

Bei Verwendung der Nucleosil-Säule und ansonsten gleichen Bedingungen wurden für in 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, befindliche S-Nitroso-Substanzen, ihre korrespondierenden Thiole und Nitrit folgende Retentionszeiten (als Mittelwert in min \pm SD, n = 10) gemessen: Nitrit: $2,972 \pm 0,035$, SNC: $5,950 \pm 0,054$ und $6,209 \pm 0,066$ (Doppelpeak) GSNO: $9,740 \pm 0,074$, Cystein: $4,567 \pm 0,058$ und GSH: $5,195 \pm 0,038$.

Co-Injektion einer Mischung aus 3 mM GSH und 100 μ M Nitrit in 50 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, führte bei Verwendung von Eluent A zur Bildung von 25 μ M GSNO. Zu keiner detektierbaren GSNO-Bildung führte die Co-Injektion einer Mischung aus je 100 μ M GSH und Nitrit im gleichen Puffer.

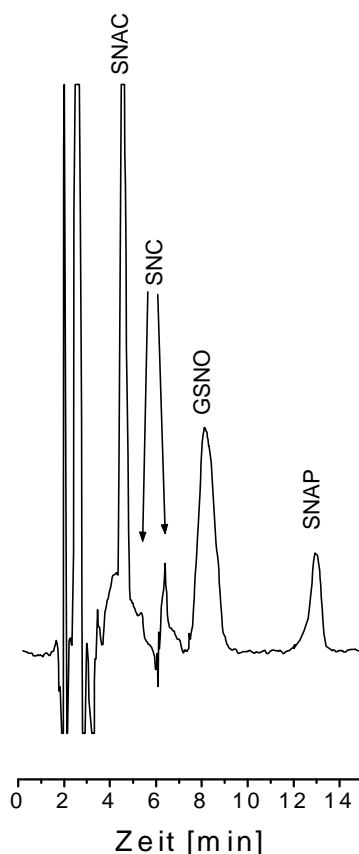


Abb. 5. HPLC-Chromatogramm aus der Analyse eines Reaktionsgemisches, bestehend aus GSNO, SNC, SNAC und SNAP und den korrespondierenden Thiolen GSH, Cystein, NAC und NAP in Tris-Puffer. UV-Absorption bei 333 nm. Packungsmaterial: ODS Hypersil, Flußrate = 1 ml/min (aus [142]).

4.1.13.2 HPLC-System B

Da dieses HPLC-System für die Analyse von GSNO als OPA-Derivat verwendet wurde, wird es in Kapitel 4.2.7.1 eingehend beschrieben.

4.1.14 Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen im Plasma mittels HPLC

Sofern der entsprechende Versuch in Vollblut und nicht schon in Plasma durchgeführt wurde, erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 800 g. Das Plasma wurde abgenommen und ein 1 ml-Aliquot durch Zentrifugation (4°C, 1200 g, 20 min) ultrafiltriert. Zur Bestimmung von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen folgte die sofortige Injektion eines 200 µl-Aliquots in das HPLC-System A. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Standards mit der/den entsprechenden S-Nitroso-Substanz(en) in 200 mM Tris-Puffer, pH 7,4.

4.1.15 Bestimmung von niedermolekularen Thiolen im Plasma mittels HPLC [44]

Diese Methode beruht auf der S-Nitrosylierung von Thiolen mit Nitrit in saurer Lösung zu den entsprechenden S-Nitroso-Substanzen und deren Detektion bei 333 nm.

500 µl-Aliquots von Plasma wurden nacheinander mit 5 µl 100 mM DTPA, 50 µl 10 mM NaNO₂, 50 µl 20 %iger 5-Sulfosalicylsäure und 50 µl 4N HCl versetzt. Nach jeder Reagenz-Zugabe erfolgte kurzes Vortex-Mischen. Zur Protein-Fällung und vollständigen Konvertierung der niedermolekularen Thiole zu den entsprechenden S-Nitroso-Substanzen wurde die Probe für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert und ein 200 µl-Aliquot in das HPLC-System A (333 nm) injiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Standards mit der/den entsprechenden S-Nitroso-Substanz(en) in 100 mM HCl.

4.1.16 Synthese von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen

Nicht-markierte und ¹⁵N-markierte S-Nitroso-Substanzen wurden durch Inkubation gleicher Teile äquimolarer deoxygenierter wässriger Lösungen der Thiole und Nitrit bzw. [¹⁵N]Nitrit, Ansäuern mit einem Zehntel Volumenanteil an 4 M HCl und Reaktion für 5 min bei RT hergestellt. Diese Stammlösungen und deren Verdünnungen wurden kurz vor Versuchsbeginn hergestellt und bis zu ihrer Verwendung vor Licht geschützt auf Eis gelagert. Mittels einer auf der Griess-Reaktion basierenden Methode [56] wurden diese Lösungen für Nitrit- und NO-frei befunden. Analyse mittels Ellman-Methode zeigte, daß keine reduzierten Thiole in der Stammlösung vorhanden waren. Die Struktur der nicht-markierten und ¹⁵N-markierten niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen wurde durch ESI-MS überprüft.

4.1.17 Präparation des Versuchstieres für die Langzeit-Infusion von GS¹⁵NO

Für diesen *in vivo*-Versuch wurde eine 400 g schwere, männliche Sprague-Dawley-Ratte verwendet. Die Ratte wurde mit einem Gemisch aus Ketamin und Xylazin i.p. (Ketamin: 70 mg/kg KG; Xylazin: 2 mg/kg KG) narkotisiert.

Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde durch einen senkrechten, ca. 1 cm langen Schnitt an der rechten Medioklavikularlinie von der klavikula aus kranialwärts die vena jugularis intera präpariert. Zwei Nähfäden wurden um das Gefäß gelegt: der eine Faden zum Ligieren des distalen Teils der Vene und der andere zur Fixierung des Polyethylen Schlauches (Außen-

durchmesser: 0,96 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm). Dieser Schlauch wurde mittels eines Querschnitts in der Gefäßwand in den proximalen Teil der Vene eingeführt. Durch einen Schnitt in der Inguinalregion wurden die vasa femoralis und der nervus femoralis bis zu ihrem Austritt unterhalb des Leistenbandes dargestellt. Die arteria femoralis superficialis wurde ligiert und durchgeschnitten, um den Zugang zu den tiefen Gefäßen zu ermöglichen. Hier wurden wiederum jeweils zwei Nähfäden um Arterie und Vene vorgelegt, die zum Ligieren der beiden Gefäße dienten. Zur Vermeidung von thrombotischen Verschlüssen wurden alle Schläuche mit Heparin gespült. Die Infusion wurde über den venösen Jugulariskatheter zugeführt. Die Blutentnahmen (ca. 0,5 ml) erfolgten über den Katheter der vena femoralis.

4.2 Eigene Methoden

4.2.1 Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen

Aus zweimal 3 ml frischem Plasma (EDTA) wurde Albumin durch Extraktion analog zur Gewinnung von SNALB-Standards mittels 5 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen gewonnen. Den beiden Extrakten (je 10 ml) wurde je 100 µl 121,3 mM DTPA zugesetzt. Nach Ultrafiltration der zwei Eluate auf insgesamt 5 ml wurde die Proteinfraction in zwei 2,5 ml-Aliquots unterteilt und mittels Sephadex PD10-Kartuschen extrahiert, so daß das Albumin-Präparat in Tris-Puffer (zweimal 3,5 ml) vorlag. Es wurde erneut durch Ultrafiltration auf insgesamt ca. 3 ml eingeeengt. Das Präparat wurde mit 100 µl 121,3 mM DTPA pro 10 ml versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert.

Die Thiol-Konzentration (nach Ellman) betrug in dem Albumin-Präparat 251 µM.

Zu je einem 1 ml-Aliquot der Albumin-Lösung in Tris-Puffer wurde Cystein bzw. GSH oder Cystein und GSH gegeben, so daß ihre Konzentrationen in den Ansätzen je 250 µM betrugen. Die S-Transnitrosylierungs-Reaktionen wurden durch Zugabe von SNALB und SNC bzw. GSNO oder SNALB, SNC und GSNO (je 20 µM im Ansatz) und Mischen gestartet.

Nach je 1 min bzw. 20 min erfolgte eine Ultrafiltration durch Zentrifugation (1200 g, 4°C , 20 min) eines 500 µl-Aliquots und Injektion des Ultrafiltrates in die HPLC (System A, Eluent A) zur Bestimmung der SNC- und GSNO-Konzentration. Dem Ultrafiltrationsrückstand wurde S^{15}NALB (8,4 µM) zugesetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Bestimmung von SNALB im Plasma mittels GC-MS (siehe Kapitel 4.2.4.3). Um sicherzustellen, daß der

Salzgehalt in den Proben nicht zu hoch war, wurden diese allerdings zunächst mit 5 ml Startpuffer verdünnt und dann mittels HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen extrahiert.

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (K_{eq}) für die Reaktionen von GSNO, SNAP bzw. SNC, SNAP und ihren korrespondierenden Thiolen in Abwesenheit von Albumin wurde von den Thiolen je 500 μM und von den S-Nitroso-Substanzen je 20 μM eingesetzt und nach 1 bzw. 20 min mittels HPLC-System A (Eluent A) analysiert. Ferner wurde in analoger Weise die Reaktion von GSNO, SNC, SNAC, SNAP und ihren korrespondierenden Thiolen im quarternären System untersucht.

4.2.2 Herstellung von $[^{14}\text{C}]\text{S}^{15}\text{NC}$ aus $[^{14}\text{C}]\text{Cystin}$

Zur Herstellung von ^{14}C -markiertem SNC mußte zunächst $[^{14}\text{C}]\text{Cystein}$ durch Reduktion von $[^{14}\text{C}]\text{Cystin}$ hergestellt werden. Vorversuche mit nicht-markiertem Cystin haben gezeigt, daß eine Reduktion mit NaBH_4 im Alkalischen nicht in Frage kommt. Sowohl während der Reaktion mit Cystin als auch bei der anschließend notwendigen Acidifizierung zur Zersetzung des überschüssigen NaBH_4 mit H_3O^+ und zur Herstellung von SNC kam es zu einem sehr starken Schäumen. Im Falle des radioaktiven Cysteins wäre dies ein nicht akzeptables Kontaminations-Risiko. Zudem würde die Neutralisation der Probe mit verdünnter Säure eine unerwünschte Verdünnung des radioaktiven Materials bedeuten.

Die Verwendung von Zink zur Reduktion von Cystin zu Cystein im Sauren eignete sich wesentlich besser. Zum einen ist das überschüssige Zink nach der Reaktion leicht durch Zentrifugation abzutrennen und zum anderen kann das frisch entstandene Cystein gleich im Sauren durch Zugabe von Nitrit zu SNC nitrosyliert werden. Da die Reduktion von Cystin zu Cystein mit Zink (und auch mit NaBH_4) bei sehr niedrigen Cystin-Konzentrationen nicht ablief, mußte dem verwendeten $[^{14}\text{C}]\text{Cystin}$ -Präparat zur Reduktion nicht-markiertes Cystin zugesetzt werden. Es wurde wie folgt vorgegangen: 100 μl der $[^{14}\text{C}]\text{-Cystin}$ -Stammlösung, 20 μl einer 1 mM Cystin in dest. Wasser und 30 μl 5 M HCl wurden mit ca. 5 mg Zinkstaub suspendiert und für 20 min unter gelegentlichem Vortex-Mischen und anschließendem Öffnen des Reaktionsgefäßes inkubiert. Anschließend folgten Zentrifugation (800 g, 5 min) und das Überführen des Überstandes in ein sauberes Reaktionsgefäß. Es wurden 10 μl einer 10 mM $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ -Lösung zugegeben. Nach 5 min wurde ein 5 μl -Aliquot mit 220 μl dest. Wasser verdünnt und ein 200 μl -Aliquot in das HPLC-System A (Eluent A) injiziert. Die Flußrate be-

trug 1 ml/min. Es wurden bis zur 20. Minute 1 min-Fractionen gesammelt und gezählt. Ein weiteres 5 µl-Aliquot des Reaktions-Ansatzes wurde direkt gezählt. Als Vergleich wurden je 5 µl des [^{14}C]Cystin-Präparats mit 220 µl einer 100 µM Cystin-Lösung in dest. Wasser verdünnt, davon ein 200 µl-Aliquot in die HPLC injiziert, bis zur 20. Minute 1 min-Fractionen gesammelt und gezählt. Ebenfalls wurden 5 µl des [^{14}C]Cystin-Präparats direkt gezählt.

Die Reinheit des erhaltenen [^{14}C]Cystein-Präparates betrug 95,2 %, die des [^{14}C]SNC-Präparates betrug 87,8 %. Abb. 6 zeigt die Auftragung der Zählraten in 1 min-Fractionen gegen die Retentionszeit für das [^{14}C]Cystin-Präparat und den [^{14}C]SNC-Ansatz in einer Superprojektion. Neben [^{14}C]SNC (8 min) ist im Radiogramm des [^{14}C]SNC-Ansatzes [^{14}C]Cystein (4 min), jedoch kein [^{14}C]Cystin zu erkennen.

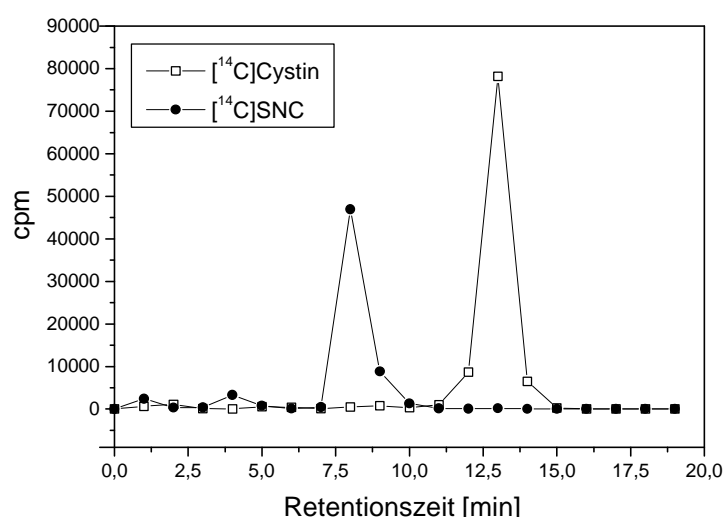


Abb. 6. Auftragung der Zählraten in 1 min-Fractionen gegen die Retentionszeit für das [^{14}C]Cystin-Präparat (offene Quadrate) und den [^{14}C]SNC-Ansatz (geschlossene Kreise). Es wurden je 73000 cpm des [^{14}C]Cystin-Präparates und des [^{14}C]SNC-Ansatzes in die HPLC (System A, Eluent A) injiziert.

4.2.3 S-Transnitrosylierungs-Experimente mit gewaschenen Erythrozyten

Abb. 7 zeigt ein Fluß-Schema der einzelnen Prozeduren, die in den Experimenten mit gewaschenen Erythrozyten durchgeführt wurden. 3 ml-Aliquots von frisch gewonnenem Blut (EDTA als Anticoagulant) von gesunden Probanden wurden zentrifugiert (4°C, 800 g, 5 min) und das Plasma komplett entfernt. Die Erythrozyten-Fraktion wurde mit 5 ml physiologischer NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert.

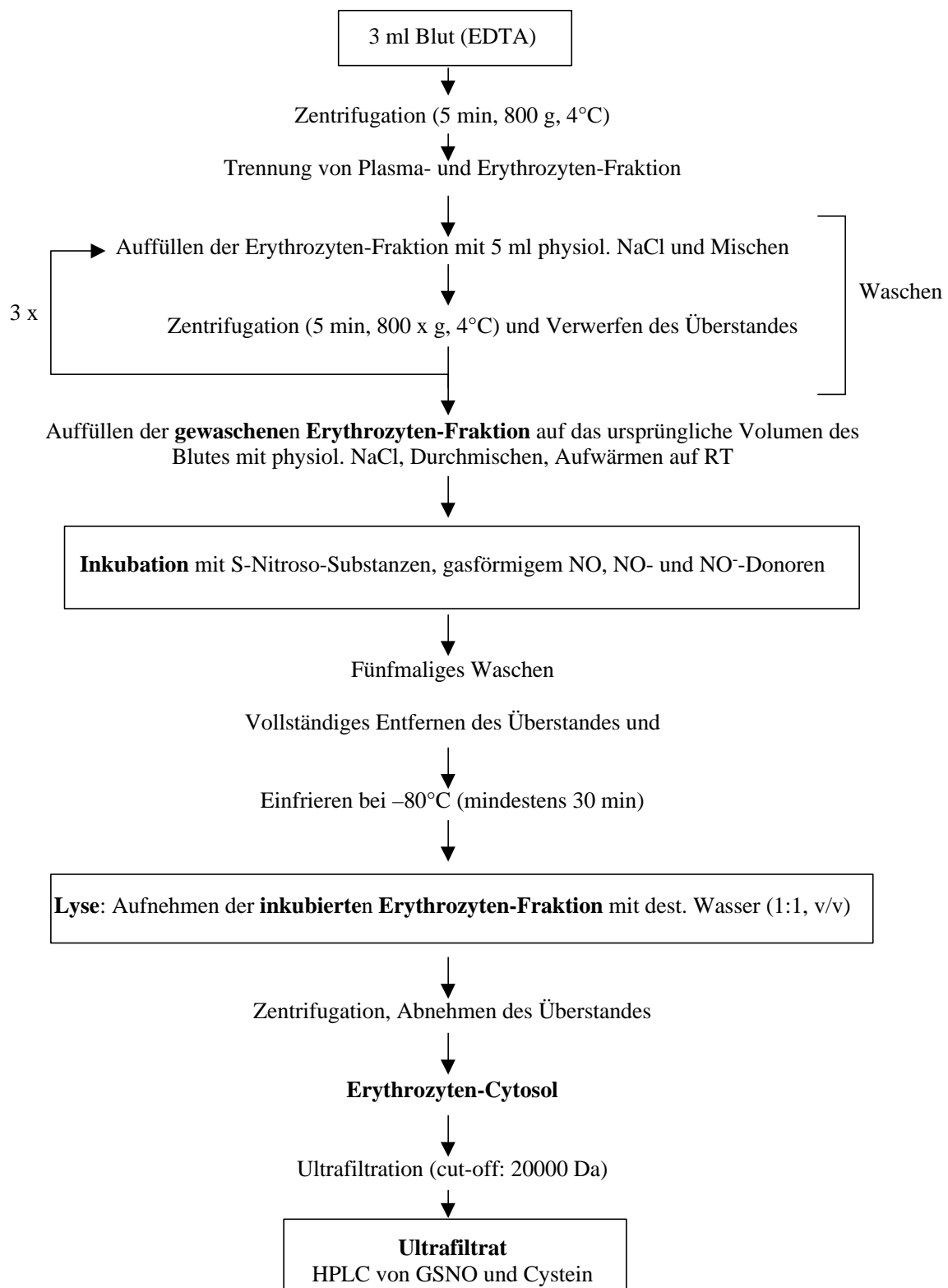


Abb. 7. Arbeitsschema für Versuche mit gewaschenen Erythrozyten.

Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und die Erythrozytenfraktion (ca. 1,5 ml) nach der letzten Waschprozedur mit 1,5 ml physiologischer NaCl suspendiert. Diese Präparate wurden mit S-Nitroso-Substanzen, NO-Gas und NO- und NO⁻-Donoren inkubiert. Die in den Experimenten angegebenen Konzentrationen beziehen sich dabei auf das gesamte Volumen der Erythrozyten-Suspensionen, d. h. auf 3 ml.

Am Ende der Inkubation wurde wiederum zentrifugiert und die oben geschilderte Waschprozedur fünfmal wiederholt. Die resultierende Erythrozyten-Fraktion wurde nach vollständigem Entfernen des Überstandes für mindestens 30 min eingefroren und danach in destilliertem Wasser (1:1, v/v) aufgenommen. Die auf diese Weise lysierten Erythrozyten wurden zentrifugiert und anschließend durch Zentrifugation (60 min, 4°C, 1200 g) ultrafiltriert. Die Messung von cytosolischem GSNO und SNC erfolgte durch Analyse eines 200 µl-Aliquots der Ultrafiltrate mittels HPLC-System A (Eluent A). Intrazelluläre GSH-Konzentrationen wurden bestimmt, indem 50 µl des Ultrafiltrats mit 450 µl physiologischer NaCl, 50 µl 50 mM Nitrit und 50 µl 5 M HCl versetzt wurden, und nach 5 min Inkubation bei RT ein 200 µl-Aliquot des Gemisches mittels HPLC analysiert wurde. Intrazelluläres Cystein wurde analog analysiert, hierfür wurden jedoch 200 µl Ultrafiltrat mit 300 µl physiologischer NaCl, 50 µl 50 mM Nitrit und 50 µl 5 M HCl für 5 min inkubiert.

In einigen Versuchen wurde intrazelluläres GSNO mittels GC-MS wie folgt bestimmt: 100 µl-Aliquots der Ultrafiltrate lysierter Erythrozyten wurden mit GS¹⁵NO (50 µM) und HgCl₂ (1 mM) versetzt, nach 10 min entsprechend der Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS weiterbehandelt und analysiert.

4.2.4 Herstellung von synthetischem SNALB und Analyse von SNALB mittels GC-MS

4.2.4.1 Synthese und Analyse von SNALB-Standards

Zu 3 ml frischem Human-Plasma wurde Butylnitrit bzw. Butyl[¹⁵N]nitrit gegeben, so daß eine Konzentration von 3,8 mM vorlag. Nach 1 h Reaktion bei RT bei pH 7,4 erfolgte das Versetzen mit 7 ml Puffer A und Extraktion über eine 5 ml HiTrapBlue Sepharose-Kartusche, die mit 10 ml Puffer A vorkonditioniert war. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer A gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 10 ml Puffer B. Die Protein-Fraktion wurde durch Zentrifugation (1800 g, 15 min, 4°C) ultrafiltriert, so daß das Volumen der Protein-Fraktion ca. 3 ml betrug.

In einem UV-Vis-Spektrophotometer wurde frisches Human-Plasma mit EDTA als Anticoagulant in dest. Wasser 1:10 verdünnt und mit 600 μM salpetriger Säure bzw. 380 μM n-Butylnitrit in 1 ml-Quarzglas-Küvetten zur Reaktion gebracht. Vor und nach Beginn der Reaktion wurden über eine Dauer von 50 min alle 5 min Spektren aufgenommen. Als Referenz diente eine 1:10 mit dest. Wasser verdünnte Plasma-Probe. Die Spektren wurden übereinandergelagert (Abb. 8 A). Die Reaktion von salpetriger Säure mit Plasma führte zu Zunahmen in der Absorption im Bereich von 300-400 nm (Abb. 8 A, links). Im Gegensatz dazu nahm bei der Reaktion von Plasma mit Butylnitrit die Absorption in diesem Bereich sogar ab (Abb. 8 A, rechts).

Diese Abnahme der Absorption kann mit der Abnahme der Butylnitrit-Konzentration im Verlaufe der Zeit durch Reaktion und Zersetzung erklärt werden, denn Butylnitrit besitzt selbst ein Absorptionsmaximum im Bereich von 300 und 400 nm (Abb. 8 B). Am Ende der Experimente wurden die S-Nitroso-Protein-Konzentrationen in den Ansätzen mittels GC-MS bestimmt. Ihre Konzentrationen betrugen 20 μM für den Ansatz mit salpetriger Säure und 22 μM für den Ansatz mit Butylnitrit. Auf der Basis des molaren Absorptionskoeffizienten der S-Nitroso-Cysteinyl-Gruppen in der Größenordnung von 900 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (siehe auch Abb. 8 B, SNAC) im Bereich um 340 nm [30] sollten 20 μM SNALB nur eine Zunahme der Absorption von 0,002 Absorptions-Einheiten bewirken. Die Zunahme um 0,4 Absorptions-Einheiten bei der Reaktion der Sulfhydryl-Gruppen mit einem 10-fachen molaren Überschuß an salpetriger Säure gegenüber kann nicht durch S-Nitrosylierung hervorgerufen werden, sondern ist sehr wahrscheinlich auf die Nitrosierung von aromatischen Gruppen in den Proteinen wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan zurückzuführen. Dadurch ist möglicherweise auch die Grünfärbung des Plasmas unter diesen Reaktionsbedingungen zu erklären, die bei Verwendung von Butylnitrit nicht auftritt. An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß Albumin nur ein reduziertes Cystein, aber 18 Tyrosin-, 31 Phenylalanin- und 1 Tryptophan-Molekül enthält [95].

Die Konzentration von SNALB und Nitrit in SNALB- bzw. S^{15}NALB -Präparaten wurden bestimmt, indem sechsmal 10 μl -Aliquots dieser Präparate mit je 90 μl Startpuffer aufgefüllt wurde. Als interne Standards dienten [^{15}N]Nitrit bzw. Nitrit (je 10 μM). Jeweils drei der sechs Proben wurden in Gegenwart von HgCl_2 (1 mM) für 1 h inkubiert. Die restlichen Proben wurden ohne HgCl_2 weiterbehandelt. Anschließend wurden alle Proben analog zur Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS aufgearbeitet. Die SNALB- bzw. S^{15}NALB -Konzentrationen in den

Standards wurden wie folgt berechnet: Die Peakflächenverhältnisse von m/z 46 zu m/z 47 (SNALB) bzw. m/z 47 zu m/z 46 ($S^{15}\text{NALB}$) wurden mit der Konzentration des jeweiligen internen Standards multipliziert. Die Nitrit- bzw. $[^{15}\text{N}]$ Nitrit-Konzentrationen (Derivatisierung ohne vorherige Behandlung mit HgCl_2) wurden von den Nitrit + SNALB- bzw. $[^{15}\text{N}]$ Nitrit + $S^{15}\text{NALB}$ -Konzentrationen (Verwendung von HgCl_2) abgezogen und dadurch die SNALB- bzw. $S^{15}\text{NALB}$ -Konzentrationen in den Stammlösungen erhalten.

Über eine Zeit-Periode von einem Jahr wurden $S^{15}\text{NALB}$ -Standards aus frischem Human-Plasma hergestellt, und zwar dreimal unter Verwendung von $[^{15}\text{N}]$ Nitrit im Säuren und achtmal unter Verwendung von $n\text{-Butyl}[^{15}\text{N}]$ nitrit. In den mit HgCl_2 behandelten Standards betrug die $[^{15}\text{N}]$ Nitrit-Konzentration $156 \pm 30 \mu\text{M}$ nach Verwendung von $[^{15}\text{N}]$ Nitrit im Säuren bzw. $188 \pm 43 \mu\text{M}$ nach Verwendung von $n\text{-Butyl}[^{15}\text{N}]$ nitrit als Nitrosylierungs-Reagenz. Vergleichbare Werte wurden erhalten, wenn die Standards mit einer Mischung aus CuSO_4 (500 nM) und Cystein (50 μM) anstatt von 1 mM HgCl_2 für 1 h inkubiert worden sind. Dies ist ein weiterer Beweis für die Bildung von $\text{S}[^{15}\text{N}]\text{ALB}$ [59].

In Abwesenheit von HgCl_2 bzw. CuSO_4 /Cystein betrugen die mittleren $[^{15}\text{N}]$ Nitrit-Konzentrationen in den $\text{S}[^{15}\text{N}]\text{ALB}$ -Präparaten $23,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (Nitrosylierung mit $[^{15}\text{N}]$ Nitrit im Säuren) bzw. $9,7 \pm 5,2 \mu\text{M}$ (Nitrosylierung mit $n\text{-Butyl}[^{15}\text{N}]$ nitrit). Es ist ungewiß, ob das $[^{15}\text{N}]$ Nitrit, das unter diesen Bedingungen in den Standards gemessen wurde, aus S-Nitroso-Gruppen oder zum Teil aus anderen nitros(y)lierten Gruppen am Albumin stammt. Der niedrigere Gehalt an freiem $[^{15}\text{N}]$ Nitrit in den mit $n\text{-Butyl}[^{15}\text{N}]$ nitrit hergestellten Standards, die höheren $\text{S}[^{15}\text{N}]\text{ALB}$ -Ausbeuten und die höhere Selektivität der Synthese verdeutlichen die bessere Eignung von $n\text{-Butyl}[^{15}\text{N}]$ nitrit als Nitrosylierungs-Reagenz zur Herstellung von $\text{S}[^{15}\text{N}]\text{ALB}$ -Standards. Unter Berücksichtigung einer Wiederfindungs-Rate von 45 % für die Extraktion von Albumin mittels HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen (ermittelt über die Protein-Bestimmung nach Bradford), zeigen diese Ergebnisse, daß etwa 300-400 μM des Albumins, entsprechend etwa 50 % des gesamten Albumins in frischem Plasma, mittels $n\text{-Butyl}$ nitrit S-nitrosyliert werden können.

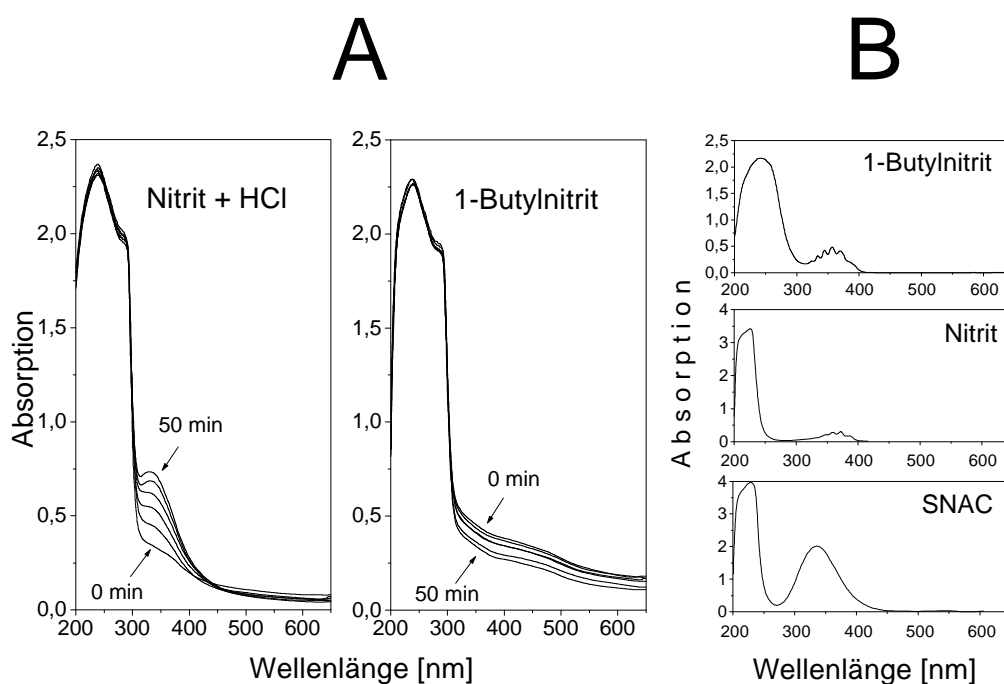


Abb. 8. **A:** UV-Vis-Spektren von Inkubations-Ansätzen von frischem Humanplasma (1:10 mit dest. Wasser verdünnt) und salpetriger Säure bei pH 2,0 (links) bzw. Butylnitrit bei pH 7,4 (rechts). Diese Spektren wurden in einer Zeitspanne von 50 min alle 5 min aufgenommen. Die Referenz-Küvette enthielt 1:10 mit Wasser verdünntes Plasma.

B: UV-Vis-Spektren von Butylnitrit (10 mM), Nitrit (9,5 mM) und SNAC (2,4 mM) in wässrigen Lösungen (pH 7,4). Die molaren Extinktionskoeffizienten berechnen sich zu $48 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Butylnitrit (bei 357 nm), $33 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für Nitrit (bei 358 nm) und $769 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für SNAC (bei 333 nm).

4.2.4.2 Synthese von Butyl[^{15}N]nitrit

650 mg (9,4 mmol) [^{15}N]Nitrit wurden in 10 ml destilliertem Wasser verdünnt und auf 0°C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde unter Rühren eine 0°C kalte Mischung aus 1,4 ml konzentrierter Schwefelsäure, 1 ml destilliertem Wasser und 800 μl (8,8 mmol) 1-Butanol zugegeben. Diese Suspension wurde 60 min bei 0°C gerührt und dann zentrifugiert. Die organische Phase wurde mittels Pasteur-Pipette abgenommen und zweimal mit 1 ml-Aliquots einer Mischung aus 25 Gew.%iger NaCl-Lösung und 2 Gew.%iger NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Mittels GC-MS wurde die Isotopen-Reinheit zu 98% ^{15}N bestimmt; dies entspricht der Isotopen-Reinheit des eingesetzten [^{15}N]Nitrits.

4.2.4.3 GC-MS-Bestimmung von SNALB in Human-Plasma nach Nitritfreisetzung mit HgCl_2

Venöses Blut wurde mit 5 ml-Monovetten mit Citrat als Anticoagulant abgenommen und die Proben sofort auf Eis gelagert. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut bei 4°C und 1800 g für 10 min zentrifugiert. Soweit dies möglich war (z.B. bei gesunden Spendern), wurden die Plasma-Proben sofort nach ihrer Gewinnung (im Labor) weiterverarbeitet. Plasma-Proben von Patienten wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

In der Regel wurde zu 400 µl-Plasma-Aliquots S^{15}NALB als interner Standard zugesetzt, so daß in der Probe eine Konzentration von 1 µM vorlag. Die Extraktion der Proteine geschah mit Hilfe von 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen. Diese wurden mit 2 ml Puffer A vor-konditioniert. Die Plasma-Proben wurden mit 1,6 ml Puffer A aufgenommen, auf die Kartusche gegeben und die Kartusche wurde mit 4 ml Puffer A gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 2 ml Puffer B. Die Protein-Fraktion wurde durch Zentrifugation (1800 g, 40 min, 4°C) ultrafiltriert, so daß das Volumen der Protein-Fraktion ca. 0,4 ml betrug.

Je zwei 100 µl-Aliquots der eingeeengten Protein-Fractionen wurden mit 10 µl 10 mM HgCl_2 versetzt und für eine Stunde inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zur Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS. Die Konzentration von SNALB im Plasma wurde nach Gleichung (7) ermittelt (siehe unten). Die Nitrit-Konzentration in den Eluatn wurde nicht bestimmt, sondern ein mittlerer Wert von 290 nM verwendet. Dieser Wert (290 ± 60 nM, Mittelwert \pm SD, $n = 50$) wurde in früheren Versuchen ermittelt.

Im Rahmen der Diplomarbeit [59], auf der die hier beschriebene und weiterentwickelte Methode zur SNALB-Bestimmung in Human-Plasma basiert, wurde deutlich, daß aufgrund der Verdünnung der Proben während der Aufarbeitung eine exakte Berechnung der basalen SNALB-Konzentration im Plasma von gesunden Probanden sehr schwierig ist. Da die endogene SNALB-Plasma-Konzentration in der Größenordnung der Nitrit-Konzentration im Puffer B zu sein schien und durch die Extraktion eine weitere Verdünnung der SNALB-Konzentration, aber nicht der Nitrit-Konzentration hervorgerufen wurde, mußte Blank-Nitrit aus dem Eluat eliminiert werden oder dessen Konzentration darin exakt bestimmt werden. Dies ist sehr wichtig, weil SNALB nach dieser Methode schließlich als Nitrit gemessen wird.

Eine Entfernung des Blank-Nitrits, etwa mit Hilfe von Ammonium-Sulfamat, führte zu keinem Erfolg, da die Umwandlung von Nitrit in N_2 durch Ammoniumsulfamat nur im Säuren möglich ist und daher eine anschließende Neutralisation nötig ist, die wieder mit einem Nitrit-Eintrag verbunden ist. Eine Behandlung von HiTrapBlue Sepharose-Protein-Extrakten auf diese Weise führte zur teilweisen Fällung der Proteine bei der Neutralisierung. Es wurde daher für eine korrekte Berechnung der SNALB-Plasma-Konzentration eine Formel entwickelt, die der Problematik des ubiquitären Nitrits gerecht wird und die einzelnen Schritte der Proben-Aufarbeitung hinsichtlich Ausbeute und Verdünnung (und wieder Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration) berücksichtigt:

Das Peakflächenverhältnis $R = \frac{m/z\ 46}{m/z\ 47}$ aus der GC/MS-Analyse des Eluats setzt sich wie folgt zusammen:

$$R = \frac{m/z\ 46}{m/z\ 47} = \frac{N_{NO_2^-}^E + N_{SNALB}^E}{N_{IS}^E} \quad (1)$$

mit $N_{NO_2^-}^E$: Menge von $^{14}NO_2^-$ im Eluat

N_{SNALB}^E : Menge von $S^{14}NALB$ im Eluat

N_{IS}^E : Menge von $S^{15}N$ ALB, dem internen Standard (I.S.), im Eluat

Die Menge von endogenem $S^{14}NALB$ (N_{SNALB}^E) und dem extern zugesetzten internen Standard $S^{15}N$ ALB (N_{IS}^E) im Eluat hängt von der Menge von $S^{14}NALB$ bzw. $S^{15}N$ ALB im Plasma N_{SNALB}^P bzw. N_{IS}^P und der Ausbeute der Extraktion ab:

$$N_{SNALB}^E = N_{SNALB}^P \cdot A = c_{SNALB}^P \cdot V^P \cdot A \quad (2) \quad \text{bzw.}$$

$$N_{IS}^E = N_{IS}^P \cdot A = c_{IS}^P \cdot V^P \cdot A \quad (3)$$

mit c_{SNALB}^P : Konzentration von $S^{14}N$ ALB im Plasma

c_{IS}^P : Konzentration des internen Standards im Plasma

V^P : Volumen des extrahierten Plasmas

A : Ausbeute der Extraktion

Für $N_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}}$ gilt entsprechend:

$$N_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}} = c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}} \cdot V^{\text{E}} \quad (4)$$

mit $c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}}$: Konzentration von Nitrit im Eluat

V^{E} : Volumen des Eluats bzw. der eingengten Proteinfraction

Gleichung (1) kann durch Einsetzen von Gleichung (2), (3) und (4) in Gleichung (5) umgewandelt werden:

$$R = \frac{V^{\text{E}} \cdot c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}} + c_{\text{SNALB}}^{\text{P}} \cdot V^{\text{P}} A}{c_{\text{IS}}^{\text{P}} \cdot V^{\text{P}} \cdot A} = \frac{V^{\text{E}} \cdot c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}}}{c_{\text{IS}}^{\text{P}} \cdot V^{\text{P}} \cdot A} + \frac{c_{\text{SNALB}}^{\text{P}}}{c_{\text{IS}}^{\text{P}}} \quad (5)$$

Auflösen von Gleichung (5) nach $c_{\text{SNALB}}^{\text{P}}$ führt über Gleichung (6) schließlich zu Gleichung (7):

$$\Leftrightarrow c_{\text{SNALB}}^{\text{P}} = \left[R - \frac{1}{A} \cdot \frac{V^{\text{E}}}{V^{\text{P}}} \cdot \frac{c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}}}{c_{\text{IS}}^{\text{P}}} \right] \cdot c_{\text{IS}}^{\text{P}} \quad (6)$$

$$\Leftrightarrow c_{\text{SNALB}}^{\text{P}} = c_{\text{IS}}^{\text{P}} \cdot R - \frac{1}{A} \cdot \frac{V^{\text{E}}}{V^{\text{P}}} \cdot c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}} \quad (7)$$

Bekannt sind folgende Daten [59,60]: $\frac{V^{\text{E}}}{V^{\text{P}}} = 5, A = 0,45$.

Gleichung (7) macht deutlich, daß die Bestimmung der SNALB-Konzentration im Plasma die Bestimmung des Verhältnisses R in der Protein-Fraktion und der Nitrit-Konzentration im Eluat erfordert.

Die Konzentration von Nitrit ($= c_{\text{NO}_2^-}^{\text{E}}$) in Puffer B (d.h. im Eluat) betrug 290 ± 60 nM, $n = 50$) und ist somit relativ konstant. Es müßte daher möglich sein, mit Hilfe der Gleichung (7) und des gemessenen Verhältnisses R die Konzentration von SNALB im Plasma zu bestimmen.

Die Gültigkeit der Gleichungen (5) und (7) wurde wie folgt überprüft: Ein 2 ml-Aliquot von Puffer A, der $4,4 \mu\text{M}$ S^{15}NALB und $4,3 \mu\text{M}$ SNALB enthielt, wurde über eine 5 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartusche extrahiert und die Protein-Fraktion mit 10 ml Puffer B eluiert. Das

Verhältnis R wurde in der erhaltenen Protein-Fraktion nach Ultrafiltration auf verschiedene V^E -Volumina bestimmt. Auftragung des gemessenen Verhältnisses R (y) gegen V^E (x) führte nach linearer Regressions-Analyse zur folgenden Geradengleichung: $y = 1,09 + 0,388 x$, $r = 0,982$.

Dieses Ergebnis macht deutlich, daß der Term $\frac{1}{A} \cdot \frac{V^E}{V^P} \cdot \frac{c_{NO_2^-}^E}{c_{IS}^P}$ der Gleichung (5) sich durch Ultrafiltration nicht ändert. Der y-Achsenabschnitt der Geraden stimmt gut mit dem theoretischen Verhältnis $\frac{c_{SNALB}^P}{c_{IS}^P}$ überein, das sich zu $4,3:4,4 = 0,977$ berechnet. Aus der Steigung der Regressionsgeraden wurde die Nitrit-Konzentration im verwendeten Puffer ($c_{NO_2^-}^E$) berechnet. Dieser beträgt 339 nM und liegt nahe dem mittels GC-MS-Analyse bestimmten Wert von 306 ± 20 nM, $n = 9$. Diese Ergebnisse zeigen, daß mit Gleichung (7) SNALB-Plasma-Konzentrationen akkurat berechnet werden können.

4.2.4.4 Validierung der Methode für die Bestimmung von SNALB in Human-Plasma

Zur Bestimmung der *precision* der Methode wurde folgendes Experiment durchgeführt: Frisches Plasma eines gesunden Spenders wurde mit S^{15} NALB (1 μ M) und SNALB (0, 2 und 10 μ M) versetzt. Die Plasma-Proben wurden in 400 μ l-Aliquots aufgeteilt und fünf dieser Proben bei 4°C, der Rest bei –80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Die bei 4°C gelagerten Proben wurden am ersten Tag parallel analysiert. Die hierbei erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung der *intra-assay precision* verwendet. An den folgenden 4 Tagen wurden die eingefrorenen Proben einzeln aufgetaut und am selben Tag analysiert. Anhand der hierbei erhaltenen Daten wurde die *inter-assay precision* berechnet.

Die SNALB-Konzentrationen in den Plasma-Proben wurden zu $0,43 \pm 0,04$ μ M (8,6 %), $2,46 \pm 0,12$ μ M (4,7 %) und $10,3 \pm 0,3$ μ M (3,3 %) bestimmt (Angaben als Mittelwerte \pm SD (RSD in %)), wenn die Plasma-Proben am Tag ihrer Gewinnung analysiert wurden. Bei Analysen an fünf aufeinander folgenden Tagen betrugen die entsprechenden Werte $0,43 \pm 0,04$ μ M (9,3 %), $2,4 \pm 0,16$ μ M (6,6 %) und $10,3 \pm 0,3$ μ M (2,9 %).

Zur Bestimmung der *accuracy* wurden 400 μ l-Aliquots frisches Plasma eines gesunden Spenders mit S^{15} NALB (1 μ M) und SNALB (0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 μ M) versetzt und alle Proben am selben Tag wie folgt behandelt: Nach Extraktion der Proben mittels 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen wurden je zwei 100 μ l-Aliquots der Eluate derivatisiert und analysiert.

Die verbleibenden Protein-Fractionen, deren Volumen je ca. 1,8 ml betrugen, wurden zur Eingung auf ein Volumen von ca. 0,4 ml ultrafiltriert. Je vier 100 µl-Aliquots von diesen Proben wurden ebenfalls derivatisiert und analysiert.

Die einzelnen Daten über die *accuracy* der Methode für ultrafiltrierte und nicht ultrafiltrierte Proben sind in Tab. 2 zu finden. Die mittlere *accuracy* betrug nach diesen Daten 99 % für ultrafiltrierte und 102 % für nicht ultrafiltrierte Proben. Die entsprechenden mittleren RSD-Werte betrugen 5,2 bzw. 7,8 %.

Tab. 2. *Accuracy* der Methode zur SNALB-Bestimmung in Human-Plasma mittels GC-MS.

SNALB, zugegeben [µM]	SNALB, gefunden [µM] [Mittelwert ± SD, (RSD, %)]		<i>accuracy</i> [%]	
	Ohne Ultrafiltration	Mit Ultrafiltration	Ohne Ultrafiltration	Mit Ultrafiltration
0,0	0,111 ± 0,018 (16)	0,146 ± 0,017 (11,6)	n.a.	n.a.
1,0	1,235 ± 0,148 (12)	1,155 ± 0,064 (5,5)	111	101
2,0	2,090 ± 0,226 (10,8)	2,155 ± 0,127 (6,0)	99	98
4,0	4,195 ± 0,233 (5,6)	4,090 ± 0,198 (4,8)	102	99
6,0	6,130 ± 0,156 (2,5)	6,025 ± 0,199 (2,9)	100	98
8,0	8,050 ± 0,255 (3,2)	8,030 ± 0,255 (3,2)	99	99
10,0	10,185 ± 0,488 (4,8)	10,045 ± 0,262 (2,6)	101	99
Mittlere RSD/ mittlere <i>accuracy</i> [%]	7,8	5,2	102	99

Die Konzentration des internen Standards (S¹⁵NALB) betrug 1 µM. Die Konzentration des Blank-Nitrits in Puffer B betrug 290 ± 60 nM (Mittelwert ± SD, n = 50). Zur Berechnung der SNALB-Konzentrationen wurde Gleichung (7) benutzt (aus [61]). *n.a.* = *nicht anwendbar*

Das LOD wurde bestimmt, indem Lösungen von verschiedenen S¹⁵NALB-Konzentrationen in Puffer B angesetzt wurden (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 80 und 100 nM). Je drei 100 µl-Aliquots dieser Lösungen wurden ohne vorherige Extraktion über HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen derivatisiert und analysiert. Die Auftragung des Peakflächenverhältnisses von m/z 47 zu m/z 46 (y) aus den GC-MS-Analysen gegen die S¹⁵NALB-Konzentrationen (in nM) (x) führte nach linearer Regressions-Analyse zu einer Geraden mit der Gleichung: $y = 0,0054 + 0,0017 x$, $r = 0,993$. Die mittleren Verhältnisse von m/z 47 zu m/z 46 betrugen 0,0052 mit einer RSD von 2,7 % für 0,0 nM S¹⁵NALB und 0,0058 mit einer RSD von 5,7 % für 0,2 nM S¹⁵NALB. Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis betrug 27,7:1 ± 1,5

(RSD = 5,5 %) für 0,2 nM S¹⁵NALB. Die hierbei in die GC-MS injizierte Stoffmenge berechnet sich zu 67 amol. Das LOD der Methode beträgt somit 67 amol.

Das *limit of quantitation* (LOQ) wurde folgendermaßen bestimmt: Für jede Konzentration wurden 1,5 ml-Aliquots von frischem Plasma eines gesunden Spenders mit S¹⁵NALB (0,85 µM) und verschiedenen SNALB-Konzentrationen (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,7 und 1,0 µM) versetzt. Je drei 0,4 ml-Aliquots wurden mittels HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen extrahiert und die Protein-Fractionen durch Ultrafiltration auf Volumina von je ca. 0,4 ml eingengt. Je vier 100 µl-Aliquots dieser Lösungen wurden derivatisiert und analysiert. Die Auftragung der gemessenen SNALB-Konzentrationen (y) gegen die zugegebenen SNALB-Konzentrationen (x) aus den GC-MS-Analysen führte nach linearer Regressions-Analyse zu einer Geraden mit der Gleichung: $y = 98 + 1,073 x$, $r = 0,990$. Die Konzentration des endogenen SNALB im verwendeten Plasma wurde somit zu 98 nM bei einer RSD von 7,7 % bestimmt. Die niedrigste extern zugegebene SNALB-Konzentration (100 nM) wurde mit einer mittleren *accuracy* von 105 % und einer mittleren *imprecision* (RSD) von 6,2 %, die extern zugegebene SNALB-Konzentration von 200 nM wurde mit einer mittleren *accuracy* von 92,3 % und einer mittleren *imprecision* von 11,7 % bestimmt. Das LOQ der Methode beträgt somit 100 nM.

4.2.4.5 Untersuchungen zu Interferenzen bei der Analyse von SNALB in Plasma

Mögliche Interferenzen, die bei dieser Methode auftreten könnten, wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht und sind in [61] publiziert worden. Es sei hier zusammenfassend angemerkt, daß niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen in physiologischen Konzentrationen nach Extraktion von Plasma über HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen zu keiner nennenswerten Interferenz führen können. In Eluaten von über diese Säulen extrahierten SNC- bzw. GSNO-Lösungen konnten 1,7 bzw. 1,2 % der aufgegebenen Konzentrationen (je 24 µM in Puffer A) gemessen werden.

Plasma-Proteine (untersucht als HSA) führen zu keiner nennenswerten Störung der SNALB-Bestimmung. Eine geringfügige und über einen Konzentrationsbereich von 0-10 µM konstante Erhöhung der gemessenen HSA-Konzentrationen gegenüber HSA-freien Proben ist sehr wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Nitrit im für diese Versuche verwendeten HSA-Präparat zurückzuführen.

Ein Risiko für Interferenzen ist die unsachgemäße Gewinnung von Plasma. Ist das Plasma hämolytisch, so ist eine Interferenz durch S-Nitroso-Hämoglobin, von dem berichtet wurde, daß es endogen vorkommt [102], sehr wahrscheinlich, da Hämoglobin mit der HSA-Fraktion von HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen coeluiert.

Die verwendeten SNALB-Standards haben nach ihren Analysen über Gel-Elektrophorese eine Reinheit von etwa 90 % und auch nitrosierbare Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, wie sie beim veralteten Herstellungsverfahren von SNALB-Standards über die Reaktion mit salpetriger Säure auftreten, haben praktisch keinen Einfluß auf die gemessenen SNALB-Konzentrationen.

4.2.5 Bestimmung von GSNO und SNC mittels GC-MS

Basierend auf der GC-MS-Methode zur Bestimmung von Nitrit [58] wurde eine Methode entwickelt, in der unter Verwendung der entsprechenden ^{15}N -markierten S-Nitroso-Substanz als interner Standard und der spezifischen Freisetzung von Nitrit aus S-Nitroso-Substanzen mittels HgCl_2 S-Nitroso-Substanzen quantifiziert und sehr niedrige Konzentrationen von ^{15}N -markierten S-Nitroso-Substanzen detektiert werden können. Eine spezifische Bestimmung von GSNO und SNC ist möglich, wenn vor der HgCl_2 -Zugabe eine HPLC-Trennung vorgenommen wird.

4.2.5.1 Bestimmung von GSNO, SNC und Nitrit in gepufferten wäßrigen Lösungen

Es wurden frische Lösungen von GSNO, SNC und Nitrit im Konzentrationsbereich von 0-1000 nM in 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, hergestellt. Zu je zwei 100 μl -Aliquots dieser Proben wurden 50 pmol des entsprechenden internen Standards (GS^{15}NO , S^{15}NC oder $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$) zugesetzt und entsprechend der GC-MS-Bestimmung von Nitrit weiterbehandelt. Je zwei weitere 100 μl -Aliquots der Proben wurden ebenfalls wie für die GC-MS-Bestimmung von Nitrit aufgearbeitet, es wurden aber zusätzlich 10 μl 10 mM HgCl_2 zu den Derivatisierungs-Ansätzen gegeben. Durch Multiplikation der Peakflächenverhältnisse von m/z 46 zu m/z 47 aus den GC-MS-Analysen mit der Konzentration des entsprechenden internen Standards (500 nM) wurden die GSNO-, SNC- und Nitrit-Konzentrationen berechnet. Zur Berechnung der *accuracy* der Methode wurde die im verwendeten Puffer vorhandene Nitrit-Konzentration, bestimmt zu 294 ± 45 nM (Mittelwert \pm SD, $n = 12$), von den gemessenen Konzentrationen ab-

gezogen. Die RSD aus Doppelbestimmungen wurde für die Berechnung der Intraassay-Reproduzierbarkeit, der *imprecision*, verwendet. Tab. 3 zeigt, daß die mittlere *accuracy* bzw. die mittlere *imprecision* dieser Methode bei nahezu 100 % bzw. unter 4 % liegt. Die Auftragung der gemessenen (y) gegen die eingesetzten (x) Konzentrationen führte nach linearer Regressions-Analyse zu folgenden Geradengleichungen: $y = 9,73 + 1,009 x$, $r^2 = 0,995$ (für Nitrit), $y = -4,04 + 1,027 x$, $r^2 = 0,994$ (für GSNO), $y = 11,9 + 0,967 x$, $r^2 = 0,994$ (für SNC) in Gegenwart von HgCl_2 . In Abwesenheit von HgCl_2 trug GSNO überhaupt nicht ($y = 12,4 + 0,001 x$, $r^2 = 0,000$) und SNC teilweise ($y = 20,5 + 0,141 x$, $r^2 = 0,569$) zu Nitrit bei. Das zeigt, daß GSNO im Gegensatz zu SNC unter den Derivatisierungs-Bedingungen stabil ist. Nitrit konnte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von HgCl_2 quantitativ bestimmt werden.

Tab. 3. Accuracy und imprecision der Methode zur Quantifizierung von Nitrit, GSNO und SNC in 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, mittels GC-MS.

Konzentration, zugegeben [nM]		Konzentration, gemessen [nM; Mittelwert \pm SD]/ <i>imprecision</i> [%]/ <i>accuracy</i> [%]		
Verbindung	Nitrit	S-Nitroso-Glutathion	S-Nitroso-Cystein	
100	105 \pm 1,9/1,6/105	93,9 \pm 7,3/7,6/94	111 \pm 1,2/1,1/111	
200	196 \pm 17/8,7/98	166 \pm 6,1/3,3/83	176 \pm 5,4/3,1/88	
300	322 \pm 13/4,1/107	303 \pm 2,7/0,7/101	320 \pm 12/3,8/107	
400	407 \pm 19/4,7/102	413 \pm 17/4,1/103	412 \pm 21/5,1/103	
500	543 \pm 3,2/0,6/109	536 \pm 16/3,5/107	501 \pm 12,3/2,5/100	
600	624 \pm 14/2,2/104	627 \pm 28/4,4/105	598 \pm 21/3,6/100	
700	708 \pm 43/6,1/101	741 \pm 17/1,9/106	680 \pm 17/2,5/97	
800	806 \pm 44/5,4/101	833 \pm 5,1/0,6/104	766 \pm 23/2,9/96	
900	925 \pm 1,6/0,2/103	920 \pm 29/3,2/102	899 \pm 23/2,5/100	
1000	1009 \pm 56/5,5/101	977 \pm 21/3,2/98	973 \pm 25/2,6/97	
Mittlere <i>imprecision/accuracy</i> [%]		3,91/103,1	3,25/100,3	2,97/99,9

Zur Berechnung der *accuracy* wurde die Nitrit-Konzentration im verwendeten Puffer (gemessen als 294 ± 45 nM, $n = 12$) von jedem Meßwert subtrahiert.

Das LOD wurde durch Dreifachbestimmung von verschiedenen GS^{15}NO -Konzentrationen in 100 μl -Aliquots von 0,2 M Tris-Puffer, pH 7,4, im Bereich von 0-10 nM ermittelt. Bei einer GS^{15}NO -Konzentration von 0,1 nM lag das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis bei 20:1 und die mittlere RSD bei 7 %. Vorausgesetzt, daß die absolute Wiederfindungsrate der Methode 100 % beträgt, liegt das LOD bei 30 amol injiziertem Nitrit (als PFB-Derivat, 1 μl aus 300 μl

Toluol) und ist derzeit offenbar das niedrigste Detektions-Limit für S-Nitroso-Substanzen und Nitrit.

4.2.5.2 Bestimmung von GSNO und SNC in menschlichem Plasma-Ultrafiltrat mittels GC-MS

Die Bestimmung von SNC und GSNO, das extern zu Ultrafiltraten von frisch gewonnenem, gepooltem Human-Plasma (EDTA als Anticoagulant) zugegeben wurde, wurde folgendermaßen vorgenommen: Das Plasma wurde mit DTPA versetzt, so daß darin eine Konzentration von 600 µM vorlag. Anschließend folgte eine Ultrafiltration durch Zentrifugation (10°C, 1200 g, 60 min). Die Ultrafiltrate wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Für jede Konzentration wurde ein 250 µl-Aliquot des Ultrafiltrates mit frisch hergestellten Mischungen aus SNC und S¹⁵NC bzw. GSNO und GS¹⁵NO in dest. Wasser versetzt. Die Menge des internen Standards S¹⁵NC bzw. GS¹⁵NO betrug in jeder Probe 1,5 nmol. Die SNC- und GSNO-Mengen lagen im Bereich von 0-2,5 nmol. Sofort nach der Zugabe der S-Nitroso-Substanzen und Mischen erfolgte die Injektion eines 200 µl-Aliquots in die HPLC (System A, Eluent A). Die Fraktionen mit der Retentionszeit von SNC (1,2 ml) bzw. GSNO (0,6 ml) wurden gesammelt. Zu je zwei 100 µl-Aliquots dieser Fraktionen wurden 10 µl 10 mM HgCl₂ gegeben und die Proben analog zur Aufarbeitung für die GC-MS-Bestimmung von Nitrit weiterbehandelt.

Auftragung der Peakflächenverhältnisse von m/z 46 zu m/z 47 (y), die in den HPLC-Fractionen von SNC (y₁) bzw. GSNO (y₂) gemessen wurden, gegen die dem Plasma-Ultrafiltrat zugesetzten SNC- (x₁) bzw. GSNO-Konzentrationen (x₂) führte nach linearer Regressions-Analyse zu Geraden mit den Gleichungen $y_1 = 1,767 + 0,164 x_1$, $r = 0,998$ und $y_2 = 0,999 + 0,147 x_2$, $r = 0,989$. Während die Steigungen der beiden Geraden vergleichbar sind, ist der y-Achsenabschnitt der Geraden für SNC um einen Faktor von fast 2 größer als derjenige der Geraden für GSNO. Die mittlere Peakfläche von m/z 47 von S¹⁵NC, dessen Wert bei 126.083 ± 16.714 (Mittelwert \pm SD), RSD = 13,8 %, n = 12, liegt, ist halb so groß wie der von GS¹⁵NO, dessen Wert bei 255.571 ± 35.185 (Mittelwert \pm SD), RSD = 13,3 %, n = 14, liegt. Die Ursache hierfür sind sehr wahrscheinlich die größeren HPLC-Fractionen, die für die SNC-Bestimmung gesammelt wurden und die damit einhergehende Verdünnung des internen Standards bei gleichbleibender Konzentration des im Eluenten vorhandenen Nitrits (Abb. 9). Die Auftragung der SNC- (y₁) bzw. GSNO- (y₂) Konzentrationen nach Abzug der Konzentrationen, die in Plasma-Ultrafiltraten ohne extern zugegebenes SNC bzw. GSNO gemessen

wurden, gegen die zugegebenen SNC- (x_1) bzw. GSNO- (x_2) Konzentrationen führte zu den in Abb. 10 dargestellten Regressionsgeraden mit den Gleichungen: $y_1 = 0,068 + 1,000 x_1$ bzw. $y_2 = 0,271 + 0,883 x_2$. Die Steigungen von 1,0 und 0,88 zeigen, daß die relative Wiederfindungsrate von SNC und GSNO in Plasma-Ultrafiltrat in der Nähe von 100 % liegt. Die mittlere RSD lag in diesen Experimenten bei 5,1 % für SNC und bei 2,4 % für GSNO.

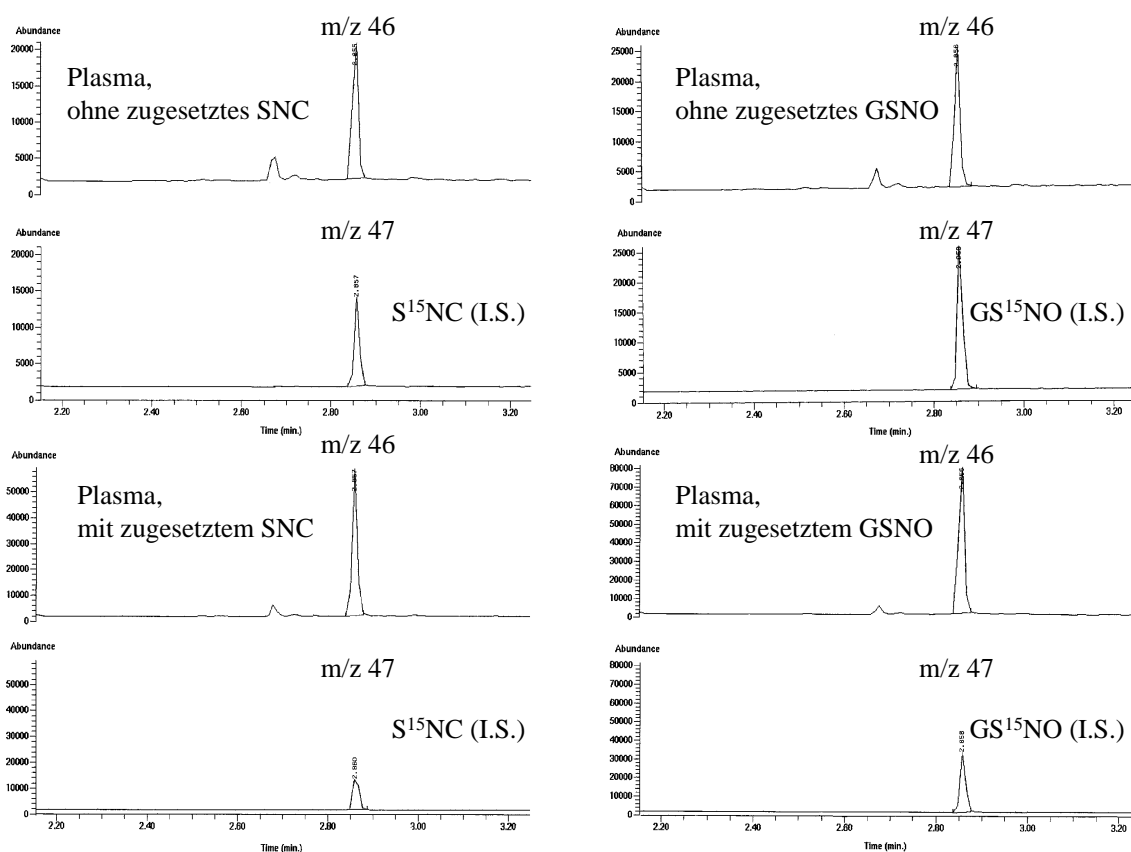


Abb. 9. Partielle GC-MS-Chromatogramme aus Analysen von SNC (linke Seite) und GSNO (rechte Seite) in Ultrafiltraten von Human-Plasma, denen SNC bzw. GSNO in einer Konzentration von 0 (obere Chromatogramme) und 10 μM (untere Chromatogramme) zugesetzt wurde. Vor der GC-MS-Analyse erfolgte die Trennung der S-Nitroso-Substanzen mittels HPLC. Die internen Standards (I.S.) S^{15}NC und GS^{15}NO wurden zu den Ultrafiltraten in Konzentrationen von je 6 μM gegeben. *Selected ion monitoring* (SIM) von m/z 46 (obere Spuren) bzw. m/z 47 (untere Spuren) wurde für die nicht-markierten bzw. für die ^{15}N -markierten Substanzen durchgeführt. Die Peaks bei m/z 46 in den oberen Chromatogrammen stammen nicht von endogenem SNC bzw. GSNO, sondern von Nitrit aus dem Puffer.

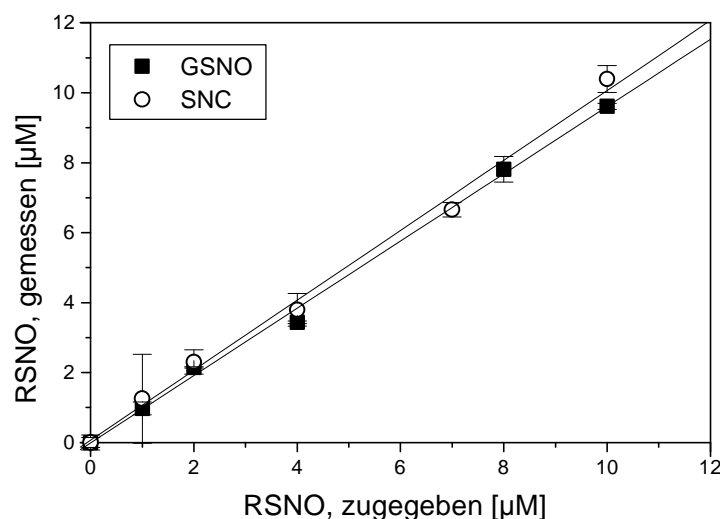


Abb. 10. Verhältnis zwischen den zum Ultrafiltrat von menschlichem Plasma zugegebenen Konzentrationen der S-Nitroso-Substanz (RSNO) SNC bzw. GSNO und den gemessenen Konzentrationen. Die Konzentrationen von $S^{15}NC$ und $GS^{15}NO$ betrugen je $6\ \mu M$ in den Ultrafiltrat-Proben. Die gemessenen Konzentrationen in den Proben, denen kein SNC bzw. GSNO zugesetzt wurde, wurden von den anderen abgezogen. Nach Sammlung der HPLC-Fractionen mit der Retentionszeit von SNC bzw. GSNO folgte GC-MS-Analyse. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

4.2.6 Qualitativer Nachweis von $[^{15}N]$ Nitrit und ^{15}N -markierten S-Nitroso-Substanzen

Zum qualitativen Nachweis von $[^{15}N]$ Nitrit und ^{15}N -markierten S-Nitroso-Substanzen wurden $200\ \mu l$ -Aliquots von Ultrafiltraten aus biologischen Proben oder wässrigen, Protein-armen Proben in HPLC-System A oder B (möglich mit allen im Rahmen dieser Arbeit benutzten HPLC-Eluenten) injiziert und 0,5 min- oder 1 min-Fractionen gesammelt. In den Sammelgefäßen ($4\ ml$ -Polypropylen-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäßen) wurde $HgCl_2$ vorgelegt, so daß in der gesammelten Fraktion eine Konzentration von $1\ mM$ vorlag. Anschließend wurden $100\ \mu l$ -Aliquots ohne Zugabe eines internen Standards wie für die Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS beschrieben aufgearbeitet. Die Auftragung der Peakflächenverhältnisse von $m/z\ 47$ zu $m/z\ 46$ gegen die Zeit liefert Chromatogramme, bei denen sich die Gegenwart einer S-Nitroso-Substanz durch eine Erhöhung des Peakflächenverhältnisses $m/z\ 47$ zu $m/z\ 46$ zur Retentionszeit dieser Substanz bemerkbar macht (in Abb. 59, Kapitel 5.7.1 ist ein Beispiel eines solchen Chromatogramms zu sehen). Zur exakten Quantifizierung der S-Nitroso-Substanzen ist diese Methode jedoch nicht geeignet, da im Eluenten durch Verschleppung von Nitrit und Nitrit-freisetzenden Substanzen die Nitrit-Konzentration zu stark schwanken kann.

4.2.7 Bestimmung von GSNO mittels HPLC mit Fluoreszenz- und UV-Absorptions-Detektion nach Vor-Säulen-Derivatisierung mit OPA

Die hier entwickelte Methode zur HPLC-Analyse von GSNO basiert auf der einzigartigen Reaktion von GSH mit OPA zur Bildung eines trizyklischen, stabilen und fluoreszierenden Isoindol-Derivats [68]. Die Ausweitung dieser Methode auf GSNO setzt eine Umwandlung von GSNO in GSH und eine vorgeschaltete Eliminierung von GSH voraus, welches ursprünglich in der Matrix, z.B. Plasma, vorhanden ist.

4.2.7.1 HPLC-System B

Die verwendeten Geräte (Pumpen und Detektoren) sind in Kapitel 4.1.13 beschrieben. Als Trennsäule wurde hier ausschließlich die mit Nucleosil 100-5 C₁₈, 5 µm Partikel-Größe, gepackte Säule von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Zusätzlich zum UV-Detektor war, wie in 4.1.13 beschrieben, ein Fluoreszenz-Detektor parallel geschaltet.

Als mobile Phase dienten die im Materialien- und Chemikalien-Teil angegebenen Eluenten C, D und E. Isokratische Läufe wurden bei einer Flußrate von 1-1,4 ml/min durchgeführt.

Es wurde bei einer Wellenlänge von 338 nm zur Detektion nicht derivatisierter S-Nitroso-Substanzen und deren OPA-Derivate gearbeitet. Der Fluoreszenz-Detektor war auf Excitations/Emissions-Wellenlängen von 338 nm/458 nm eingestellt.

4.2.7.2 Isolierung von GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten und wäßrigen Lösungen

200 µl-Aliquots der Probe wurden in das HPLC-System B (Eluent D) injiziert und der HPLC-Peak (1,4 ml) mit der Retentionszeit von GSNO ($3,019 \pm 0,081$ min) gesammelt. Die Flußrate betrug hier 1,4 ml/min. Die Retentions-Zeiten von GSSG, Cystin, Cystein und GSH betrugen $1,825 \pm 0,005$, $1,925 \pm 0,012$, $1,959 \pm 0,059$ und $2,326 \pm 0,039$ min (alle Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 4). Unter diesen Bedingungen konnten 4 Plasma-Ultrafiltrate nacheinander injiziert werden. Anschließend wurde die Säule für 20 min mit Acetonitril gespült.

4.2.7.3 Derivatisierungs-Prozeduren

Die Derivatisierung von GSH und GSNO in wäßrigen gepufferten Lösungen mit OPA wurde durch Vortex-Mischen von 1 ml-Aliquots von GSH- bzw. GSNO-Lösungen in 75 mM Borat-Puffer, pH 8, mit 50 µl-Aliquots des entsprechenden OPA-Reagenzes bei RT durchgeführt.

200 µl-Aliquots wurden auf die HPLC-Säule (System B, Eluent E) injiziert. Die Derivatisierung von GSH in Abwesenheit von GSNO wurde für 2 min mit OPA-Reagenz A durchgeführt, während die Derivatisierung von GSNO in Gegenwart von GSH mit OPA-Reagenz B oder C durchgeführt wurde. Um GSH (5 µM) aus GSNO-Lösungen zu eliminieren, wurden diese Gemische mit einem 20-molaren Überschuß von *N*-Ethylmaleimid (NEM) gegenüber GSH für 5 min inkubiert. Eine 5 µM GSH-Konzentration wurde gewählt, da sie der in menschlichem Plasma vorhandenen GSH-Konzentration entspricht [96]. Anschließend wurde ein 50 µl-Aliquot der OPA-Reagenzien B oder C zum Reaktionsgemisch gegeben. Als optimale Inkubationszeit zur quantitativen GSNO-Bestimmung wurde 40 min ermittelt (siehe unten).

Zur Bestimmung von GSNO in HPLC-Fractionen wurde ein 0,7 ml-Aliquot der gesammelten HPLC-Fraktion mit 0,3 ml 75 mM Borat-Puffer, pH 8, und 2 µl 121 mM NEM versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT folgte die Zugabe von 100 µl OPA-Reagenz B und 40 min Inkubation. Von diesem Ansatz wurden anschließend 200 µl in die HPLC (System B, Eluent D) injiziert.

4.2.7.4 Entwicklung, Optimierung und Validierung der Methode

Die Reaktion von GSH mit OPA-Reagenz A führte zu einer schnellen Bildung eines UV-Licht absorbierenden und fluoreszierenden Derivats mit Absorptions-/Emissions-Wellenlängen von 338 und 458 nm (Abb. 11 und Abb. 12). Die OPA-Derivate von GSH eluierten von der HPLC bei 8,1 min (Abb. 11, links). Die Reaktion von GSH (1 µM) mit OPA-Reagenz A war nach 2 min beendet. Im Gegensatz dazu reagierte GSNO mit OPA-Reagenz A nur sehr langsam: Nach 40 min hatte weniger als 5 % des GSNO zum OPA-Derivat reagiert, das bei 8,1 min eluiert (HPLC-System B, Eluent E). Wenn aber OPA-Reagenz B oder C verwendet wurde (d. h. in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol oder NAC), war die Bildung des UV- (Abb. 11, mittleres Bild) und Fluoreszenz-aktiven (Abb. 11, rechtes Bild) Derivats mit der Retentionszeit von 8,1 min erheblich beschleunigt. Interessanterweise war die Reaktion von GSH mit OPA-Reagenz B langsamer als mit OPA-Reagenz A, was die Vermutung nahelegt, daß 2-Mercaptoethanol die Reaktion von GSH mit OPA stört. Die Inkubation von 100 µM GSNO in 75 mM Borat-Puffer, pH 8, mit 12,2 mM 2-Mercaptoethanol, aber ohne OPA führte zum kompletten Verschwinden des GSNO nach einer Inkubationszeit von 120 s und zu einer maximalen Bildung von 2-(Nitrosomercapto)-ethanol. Diese Messung wurde unter Verwendung von HPLC-System B mit Eluent C durchgeführt (nicht gezeigt).

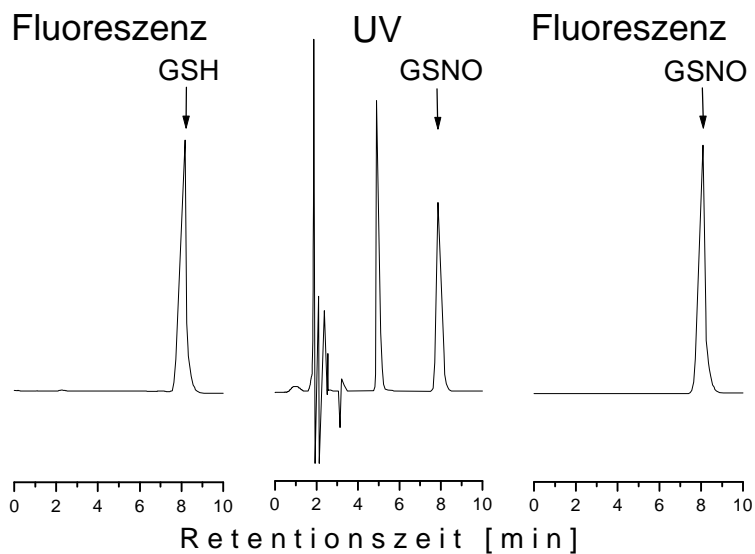


Abb. 11. HPLC-Chromatogramme (System B, Eluent E, Flußrate = 1 ml/min) aus Analysen von GSH (5 μ M) und GSNO (5 μ M) in Borat-Puffer mit Fluoreszenz-Detektion (338 nm/458 nm, Excitation/Emission) und UV-Absorptions-Detektion (338 nm) nach Derivatisierung mittels OPA-Reagenz A (GSH, 2 min) und OPA-Reagenz B (GSNO, 40 min). Die Abschwächungen der Integratoren waren 2^2 für die UV-Absorption und 2^8 für die Fluoreszenz-Detektion. Die OPA-Derivate von GSH und GSNO sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

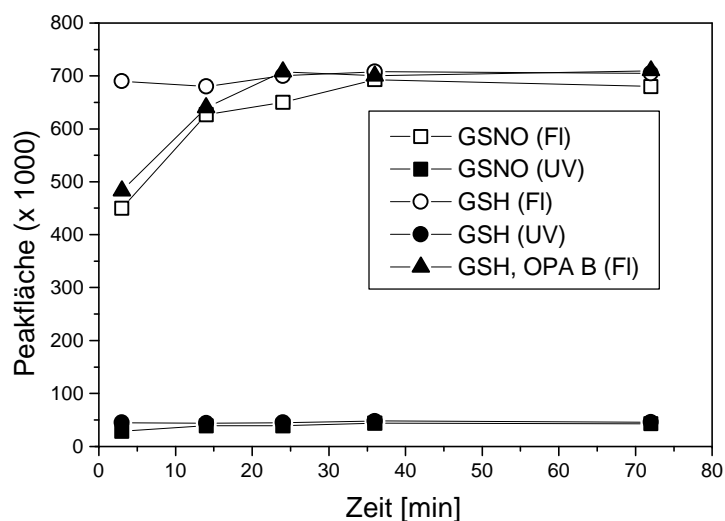


Abb. 12. Effekt der Inkubationszeit auf die Bildung der UV-absorbierenden (UV) und Fluoreszenz-aktiven (FI) Derivate, die durch die Reaktion von GSH (1 μ M) mit OPA-Reagenz A (OPA A) bzw. von 1 μ M GSNO mit OPA-Reagenz B (OPA B) gebildet wurden. Zur Analyse wurde HPLC-System B und Eluent E verwendet.

Das Derivat von GSH mit OPA, das in Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol gebildet wird, zeigt ein UV-Vis-Spektrum, das dem Spektrum des Derivates sehr ähnlich ist, welches durch Reaktion von GSNO und OPA in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol gebildet wird (nicht gezeigt). Die ermittelten Werte für die molaren Absorptionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 338 nm (Absorptions-Maxima der Derivate) betrugen $4800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für beide Derivate. Der molare Absorptionskoeffizient von nicht-derivatisiertem GSNO beträgt bei 336 nm $900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [30]. Das bedeutet, daß die Derivatisierung von GSNO mit OPA in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol zu einer Steigerung der UV-Absorption von GSNO um etwa Faktor 5 gegenüber intaktem GSNO führt. Somit können GSNO-Bestimmungen bei einer Absorptions-Wellenlänge von 338 nm zu empfindlicheren Analysen führen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Verwendung von OPA-Reagenz C erhalten (nicht gezeigt).

Unter Verwendung von HPLC-System B und Eluent C konnte eine signifikante Bildung von 2-([^{15}N]Nitrosomercapto)-ethanol bzw. S-[^{15}N]Nitroso-N-Acetylcystein (S^{15}NAC) sogar 2 min nach Inkubation von $10 \mu\text{M}$ GS^{15}NO mit OPA-Reagenz B bzw. C nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von 2-([^{15}N]Nitrosomercapto)-ethanol bzw. S^{15}NAC änderten sich während der folgenden 60 min in beiden Ansätzen nicht mehr (nicht gezeigt). Die maximale Bildung des HPLC-Peaks, der bei 8,1 min eluiert (HPLC-System B, Eluent E), wurde nach 30 bis 40 min Inkubation erreicht. Ein $200 \mu\text{l}$ -Aliquot eines Reaktionsgemisches von GS^{15}NO ($10 \mu\text{M}$) mit OPA-Reagenzien B bzw. C wurde nach 2 min Inkubation auf die HPLC (HPLC-System B, Eluent E) injiziert und 0,5 ml-Fractionen bis zu einer Retentionszeit von 15 min gesammelt. Diese wurden mit 1 mM HgCl_2 behandelt und mittels GC-MS analysiert. Die Chromatogramme zeigten Zunahmen im Peakflächenverhältnis von m/z 47 zu m/z 46 bei Retentionszeiten von Nitrit (2,5 min) und 2-(Nitrosomercapto)-ethanol (4,7 min) bzw. SNAC (3,7 min). Es wurden hingegen keine Zunahmen dieses Peakflächenverhältnisses bei der Retentionszeit von 8,1 min oder einer anderen Retentionszeit festgestellt (nicht gezeigt). Das bedeutet, daß das OPA-Derivat von GS^{15}NO offenbar keine S-[^{15}N]Nitrosogruppe mehr enthält.

Der Versuch, die Ausbeute des bei 8,1 min eluierenden Peaks durch Steigerung der NAC-Konzentration (11, 22, 48 und 70 mM) im OPA-Reagenz C zu erhöhen, führte nur zu unbedeutend höheren Ausbeuten und hatte keinen Einfluß auf die SNAC -Bildung (nicht gezeigt).

Zur Strukturaufklärung der OPA-Derivate wurden Inkubations-Ansätze von GSH mit OPA-Reagenz A bzw. GSNO und GS^{15}NO mit OPA-Reagenz B mittels HPLC (System B,

Eluent D) analysiert und die Peaks mit der Retentionszeit von 8,1 min gesammelt, mit Ameisensäure angesäuert und mittels ESI-MS analysiert. Es wurden identische Massen- und Tandem-Massenspektren aus allen drei Ansätzen erhalten. In den Massenspektren aller drei OPA-Derivate wurden Massen-Fragmente hoher Intensität bei m/z 404 (60 %), 387 (100 %) und 281 (38 %) beobachtet. Die Massen-Fragmente bei m/z 404 sind sehr wahrscheinlich dem $[M-1]^+$ - Ion zuzuordnen. Die Kollisions-aktivierte Dissoziation (30 eV) der Mutter-Ionen bei m/z 404 aller Derivate führte zu identischen Tandem-Massenspektren mit Tochter-Ionen hoher Intensität bei m/z 404 (50 %), 387 (75 %), 267 (20 %), 121 (48 %), 105 (100 %) und 69 (24 %).

Auch diese Daten legen die Annahme nahe, daß die im Rahmen dieser Methode gebildeten OPA-Derivate von GSH und GSNO die gleiche Struktur besitzen. Diese Daten sind in voller Übereinstimmung mit denen von Neuschwander-Tetri und Roll [68], die für das OPA-GSH-Derivat eine trizyklische Verbindung, nämlich 1-Alkylthio-2-alkylisoindol, hier bezeichnet als OPA-GSH, vorgeschlagen haben. Dieses Derivat wird durch Reaktion sowohl mit dem primären Amin als auch mit der Thiol-Gruppe von GSH mit OPA und Abspaltung von zwei Molekülen Wasser gebildet (Abb. 13). Diese Daten untermauern daher die Annahme, daß das OPA-Derivat von GSNO mit OPA-Reagenz B oder C keine S-Nitroso-Gruppe enthält.

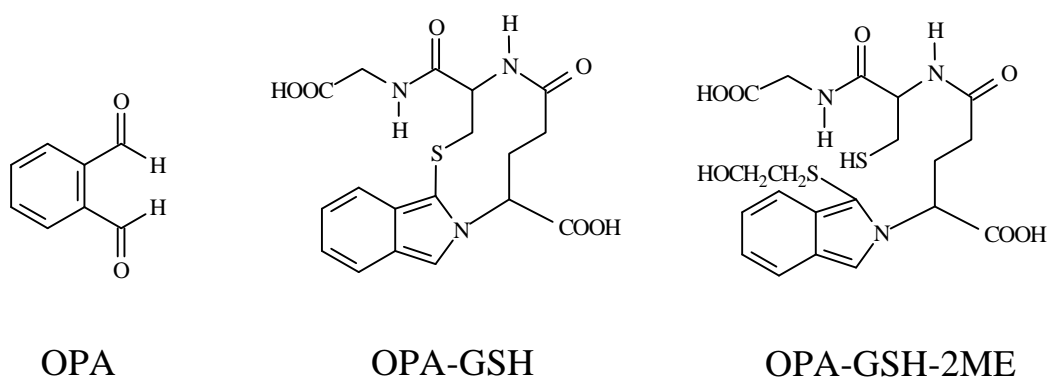


Abb. 13. Chemische Strukturen von *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und der UV-absorbierenden und fluoreszierenden Derivate, die bei der Reaktion von GSH mit OPA in Borat-Puffer bei pH 8 in An- und Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol (2ME) entstehen. In der Abwesenheit von 2ME reagiert GSH mit OPA zu einem tricyclischen Isoindol-Derivat (OPA-GSH). In Gegenwart von 2ME reagiert GSH mit OPA hauptsächlich zum OPA-GSH und zum Teil vermutlich zu einem Isoindol-Derivat mit einem Molekül GSH und einem Molekül 2ME (OPA-GSH-2ME). Durch langsame intramolekulare nucleophile Reaktion der SH-Gruppe des OPA-GSH-2ME mit dem räumlich nahen C-Atom, das die 2ME-Gruppe trägt, entsteht schließlich OPA-GSH.

Da GSH und GSNO mit OPA-Reagenz B das gleiche OPA-Derivat bilden, ist es zur spezifischen Bestimmung von GSNO in Gegenwart von GSH notwendig, das nicht aus GSNO stammende GSH vor der Derivatisierung vollständig zu entfernen. Für diesen Zweck wurde NEM verwendet. Mittels HPLC-Analyse stellte sich heraus, daß ein hoher molarer Überschuß an NEM gegenüber GSH zur zuverlässigen und vollständigen Entfernung des GSH notwendig ist. Da aber NEM wiederum mit aus GSNO gebildetem GSH reagieren würde, muß nach der Alkylierung von GSH das überschüssige NEM entfernt werden. Das wurde durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol bzw. NAC zum OPA-Reagenz erreicht. Der Effekt von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0-200 μM) und zwei NEM-Konzentrationen (240 und 480 μM) auf die Detektion von GSNO (1 μM) in Borat-Puffer (75 mM, pH 8) ist in Abb. 14 dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 50 μM störte GSH die Analyse von GSNO nicht. Bei höheren Konzentrationen trug GSH zum gemessenen GSNO bei. Eine Verdoppelung der verwendeten NEM-Konzentration im Inkubations-Ansatz senkte den Beitrag von GSH zum gemessenen GSNO bis zu einer GSH-Konzentration von 150 μM ab. Bei einer GSH-Konzentration von 200 μM hatte die Verdoppelung der NEM-Konzentration auf 480 μM keinen Effekt mehr.

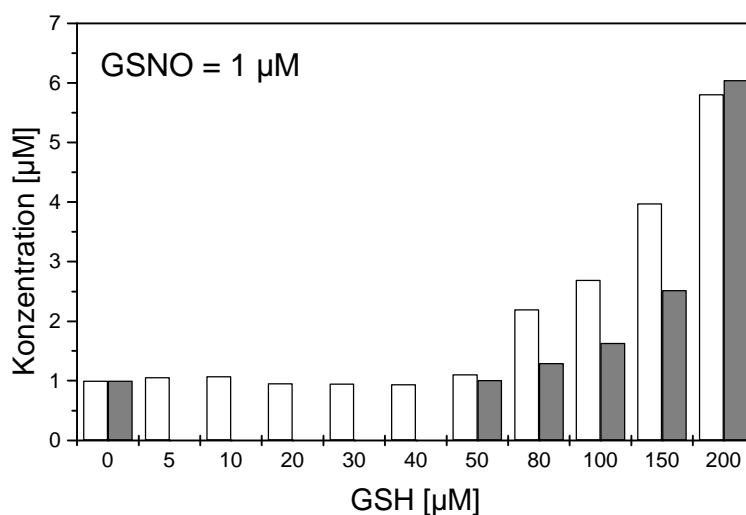


Abb. 14. Effekt von GSH und NEM auf die Fluoreszenz-Detektion von GSNO (HPLC-System B, Eluent E). 1 ml-Aliquots von wäßrigen gepufferten Lösungen von 1 μM GSNO, die GSH in den angegebenen Konzentrationen enthielten, wurden mit OPA-Reagenz B derivatisiert. Vor der Derivatisierung wurden die Ansätze mit 2 μl - (offene Säulen) bzw. 4 μl -Aliquots von 121 mM NEM (ausgefüllte Säulen) (240 bzw. 480 μM NEM in den Ansätzen) für 5 min inkubiert. Die Derivatisierung erfolgte für 40 min mit OPA-Reagenz B.

Für GSH und GSNO in An- und Abwesenheit von GSH (5 μ M) wurden Standard-Kurven in Puffer im Konzentrationsbereich von 0-1000 nM in Doppel-Bestimmung angefertigt. Lineare Regression der Peakflächen (8,1 min) vom Fluoreszenz-Signal (y_1) und UV-Absorptions-Signal (y_2) gegen die Konzentration (x) führte zu Geraden mit den Regressions-Gleichungen: $y_1 = 0,9 + 745 x$ ($r^2 = 0,991$) und $y_2 = 42 x$ ($r^2 = 0,990$) für GSH unter Verwendung von OPA-Reagenz A, $y_1 = -0,4 + 638 x$ ($r^2 = 0,993$) und $y_2 = -0,2 + 38 x$ ($r^2 = 0,995$) für GSNO in Abwesenheit von GSH unter Verwendung von OPA-Reagenz B und NEM und $y_1 = 620 x$ ($r^2 = 0,993$) und $y_2 = 1 + 39 x$ ($r^2 = 0,996$) für GSNO in Gegenwart von 5 μ M GSH unter Verwendung von OPA-Reagenz B und NEM. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch unter Verwendung von OPA-Reagenz C erhalten (nicht gezeigt). Der mittlere Variations-Koeffizient dieser Analysen war $7,4 \pm 3,5$ % bei Verwendung der UV-Absorption und $4,3 \pm 2,4$ % bei Verwendung der Fluoreszenz-Detektion. Die Daten zeigen deutlich, daß es unter diesen Derivatisierungs-Bedingungen auch bei einem sehr hohen molaren Überschuß von GSH gegenüber GSNO zu keiner Interferenz von GSH mit der GSNO-Messung kommt.

GSH wurde bei Verwendung von OPA-Reagenz A um einen Faktor von 1,1 empfindlicher gemessen als bei Verwendung von Reagenz B oder C. Für GSH und GSNO in wäßrigen Lösungen wurde ein vergleichbares LOD (bei einem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von 3:1) ermittelt: GSH und GSNO konnten unter Verwendung der Fluoreszenz-Detektion in einer Konzentration von 3 nM und unter Verwendung der UV-Absorptions-Detektion in einer Konzentration von 70 nM detektiert werden. Die dazugehörigen Variations-Koeffizienten betrugen 10,8 bzw. 15,1 %. Die OPA-Derivate von GSH (im OPA-Reagenz A) bzw. GSNO (im OPA-Reagenz B oder C) blieben mindestens 12 h unverändert, wenn sie bei RT in braunen Glasgefäßen gelagert wurden (nicht gezeigt).

Neuschwander-Tetri und Roll [68] haben gezeigt, daß GSH in menschlichem Plasma als OPA-GSH-Derivat bestimmt werden kann, wenn die Plasma-Proteine vor der Derivatisierung mit 5-Sulfosalicylsäure gefällt worden sind. Diese Vorgehensweise ist für die GSNO-Bestimmung in Plasma nicht geeignet, da unter sauren Bedingungen aus GSH und im Plasma vorhandenem Nitrit sehr schnell artifiziell GSNO gebildet werden würde [43], wenn nicht sehr hohe NEM-Konzentrationen verwendet werden. Außerdem muß vermieden werden, daß sich GSH unter den Derivatisierungs-Bedingungen mit OPA und 2-Mercaptoethanol artifiziell aus GSSG bildet. GSSG und gemischte Disulfide von GSH und anderen Thiolen kommen im

Plasma vor [96] und würden durch das 2-Mercaptoethanol zu den entsprechenden Thiolen reduziert werden. In der Tat führte die 40 minütige Derivatisierung von 1 μM GSSG in 75 mM Borat-Puffer, pH 8, mit OPA-Reagenz B zur Bildung von 1,7 μM des GSH-OPA-Derivates (Ausbeute von 85 %). Aus diesem Grunde führte auch die direkte Messung von GSNO nach Derivatisierung von Plasma-Ultrafiltrat-Proben mit OPA-Reagenz B zu nicht-reproduzierbaren Werten. Daher mußte GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten vor der Derivatisierung in intakter Form isoliert werden. Als eine gangbare Möglichkeit erwies sich die Isolierung von GSNO mittels HPLC (System B, Eluent D) vor der Derivatisierung.

Abb. 15 und Abb. 16 zeigen, daß eine spezifische und Interferenz-freie Quantifizierung von GSNO in Ultrafiltraten von menschlichem Plasma unter Verwendung von einem einzigen HPLC-System (System B, Eluent D) möglich ist. Die Ähnlichkeit der HPLC-Chromatogramme, die aus Analysen von GSNO in menschlichen Plasma-Ultrafiltraten (Abb. 15, links) und aus wäßrigen Puffer-Lösungen (Abb. 15, rechts) erhalten wurden, zeigt, daß GSNO in Plasma-Ultrafiltraten von menschlichem Plasma genauso zuverlässig bestimmt werden kann wie GSNO neben GSH in Puffer. Abb. 16 zeigt eine gute Linearität zwischen Peakfläche (y) und GSNO-Konzentrationen (x) im Bereich von 0-1000 nM im Plasma-Ultrafiltrat. Es wurde für Plasma-Ultrafiltrat die Regressions-Gleichung $y = 474 + 19,6 x$ ($r = 1,000$) erhalten. Lineare Regressions-Analyse zwischen Peakfläche (y) und GSNO-Konzentration (0-1000 μM) in Puffer (x) in Gegenwart von GSH (5 μM) führte zur Regressions-Gleichung: $y = 1085 + 21,8 x$ ($r = 0,997$). Das Verhältnis der Geraden-Steigungen der Kalibrierkurven in Plasma-Ultrafiltrat und der Standard-Kurve in Puffer beträgt 0,9. Das bedeutet eine Wiederfindungs-Rate von 90 % für GSNO aus Plasma-Ultrafiltrat. Die mittlere Variabilität im gesamten Konzentrationsbereich betrug 8 % (Variationskoeffizient).

Das LOQ dieser Methode wurde durch Vierfach-Bestimmung von Plasma-Ultrafiltraten, die mit 50, 100 und 250 nM GSNO versetzt waren, ermittelt und beträgt 100 nM bei einer *accuracy* von 85 % und einer Präzision (Variationskoeffizient) von 12 %. Das Fehlen von Peaks mit der Retentionszeit des GSH-OPA-Derivates sowohl in nicht mit GSNO versetztem Plasma-Ultrafiltrat als auch in Puffer (Abb. 15) zeigt, daß weder GSH noch GSSG noch andere in Plasma vorhandene Verbindungen die Messung von GSNO stören. Abb. 15 (linkes Chromatogramm) läßt vermuten, daß GSNO im Human-Plasma nicht in höheren Konzentrationen als 100 nM vorkommt.

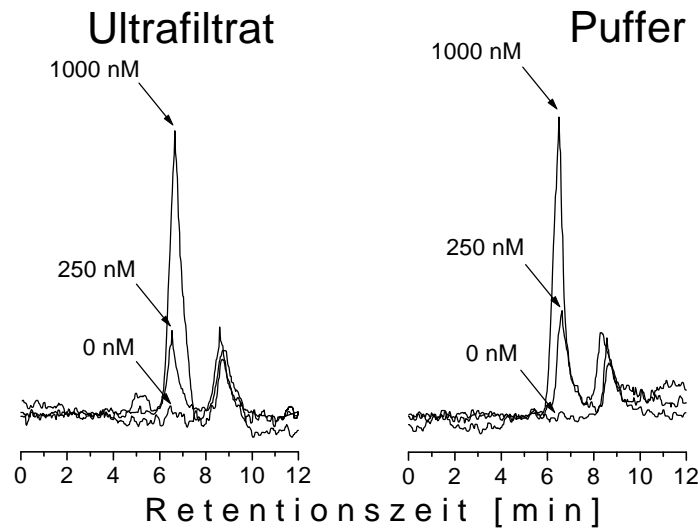


Abb. 15. HPLC-Chromatogramme (System B, Eluent E, Flußrate = 1,4 ml/min) aus Analysen von GSNO in Ultrafiltrat-Proben von Human-Plasma (links) und in Puffer (rechts) ohne und mit Zugabe von GSNO in Konzentrationen von 250 und 1000 nM. Es wurden 200 µl-Aliquots der Ultrafiltrate bzw. Puffer-Proben mittels HPLC (gleiches System) analysiert und die GSNO-Peaks isoliert. Anschließend wurden zu 0,7 ml-Aliquots der GSNO-Fractionen 300 µl Borat-Puffer, pH 8, gegeben und diese Proben für 5 min mit 240 µM NEM und mit OPA-Reagenz B für weitere 40 min inkubiert. Die Ultrafiltrat-Proben enthielten endogenes GSH (4,2 µM, gemessen mit HPLC-System A, Eluent A). Die gepufferten Lösungen enthielten alle 5 µM GSH.

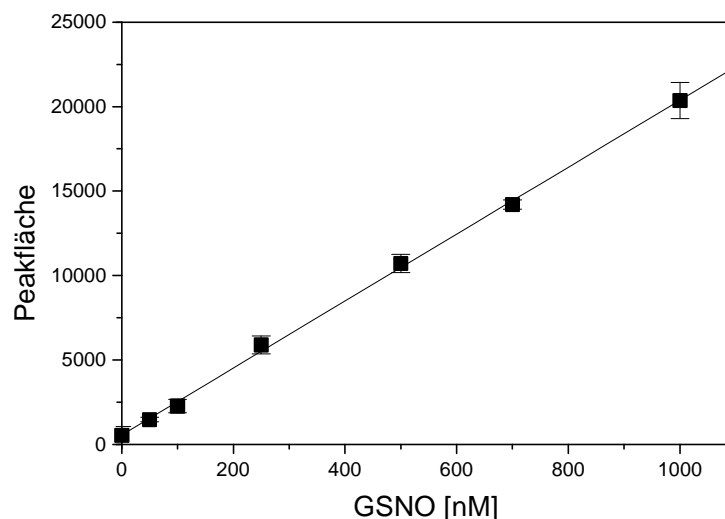


Abb. 16. Kalibrierkurve für die GSNO-Bestimmung über die Derivatisierung zu OPA-GSH in Ultrafiltrat-Proben von gepooltem Human-Plasma. GSNO wurde den Ultrafiltrat-Proben in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die endogene GSH-Konzentration im gepoolten Plasma-Ultrafiltrat betrug 3,8 µM (analysiert mit HPLC-System A, Eluent A).

4.2.8 Untersuchung der Aktivität von neuronaler NOS-Aktivität *in vitro*

4.2.8.1 NOS-Assay mittels GC-MS

Versuche mit isolierter neuronaler NOS wurden wie folgt durchgeführt: Die NOS-Cofaktoren wurden in 5 ml Puffer A verdünnt, so daß die folgenden Konzentrationen resultierten: 10 µM Tetrahydrobiopterin (H₄Bip), 5 µM Flavinadenindinucleotid (FAD), 5 µM Flavinadeninmononucleotid (FMN), 500 µM CaCl₂, 800 µM Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH).

Je 400 µl-Aliquots wurden mit L-[¹⁵N₂]Arginin und gegebenenfalls mit Hemmstoff in verschiedenen Konzentrationen versetzt und für 10 min bei 37°C vorinkubiert. In der Regel wurden die Reaktionen durch Zugabe von NOS gestartet. Die NOS-Konzentration in den Ansätzen betrug in den meisten Fällen 13 µg/ml. Bedingungen, die von den hier beschriebenen abweichen, sind in den zugehörigen Abbildungen oder in der zugehörigen Versuchsbeschreibung aufgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl-Aliquots in 1,5 ml-Glasgefäße überführt, in denen sich je ein 400 µl-Aliquot eiskaltes Aceton und ein auf das Volumen von 100 µl bezogener interner Standard von 2,5 µM [¹⁴N]Nitrit befand. Die Proben wurden sofort zur vollständigen Denaturierung der NOS gemischt, 10 µl PFB-Bromid zugesetzt und weiter für die GC-MS-Bestimmung von Nitrit aufgearbeitet und analysiert.

Im Puffer, der für die Aktivitäts-Bestimmung der neuronalen NOS verwendet wurde, lag Nitrit in einer Konzentration von 258 ± 43 nM (Mittelwert \pm SD, n = 6) vor. Eine Standard-Kurve von 0-10 µM [¹⁵N]Nitrit in Puffer unter Verwendung von 2,5 µM [¹⁴N]Nitrit als interner Standard führte nach linearer Regressions-Analyse zwischen gemessener (y) und zugegebener (x) [¹⁵N]Nitrit-Konzentration zu folgender Regressions-Gleichung: $y = 0,019 + 1,027 x$, $r^2 = 0,995$.

Das LOD dieser Methode betrug 0,2 nM [¹⁵N]Nitrit bei einem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von 20:1. Die mittlere Präzision (RSD) betrug hier 4,8 %. Das LOQ betrug 4 nM [¹⁵N]Nitrit bei einer mittleren *accuracy* von 93 % und einer mittleren Präzision (RSD) von 5,4 %. Die Nitrit-Konzentration im für diese Experimente benutzten Puffer betrug 280 nM. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Nitrit-Analysen im Rahmen der *in vitro*-NOS-Experimente in Doppelbestimmung durchgeführt. Die mittlere RSD dieser Nitrit-Messungen betrug 2,5 % (n = 183).

4.2.8.2 Optimierung der Inkubationsbedingungen

Bei Calmodulin- (CaM) und NADPH-Konzentrationen von 50 nM bzw. 800 μM war die NOS-katalysierte [^{15}N]Nitrit-Bildung aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin über eine Dauer von 2 min streng linear abhängig von der Inkubationszeit und nahm bei längeren Inkubationszeiten geringfügig ab (Abb. 17), so daß auch über Inkubationszeiten bis 10 min von einer Linearität der [^{15}N]Nitrit-Bildung gesprochen werden kann. Bei einer NADPH-Konzentration von 800 μM führte eine Erhöhung der CaM-Konzentration von 50 auf 500 nM zu einer über die gesamte Inkubationszeit erhöhten [^{15}N]Nitrit-Bildung. Der lineare Bereich der [^{15}N]Nitrit-Bildung war jedoch unter diesen Bedingungen auf Inkubationszeiten bis 2 min beschränkt und die [^{15}N]Nitrit-Bildung fiel dann sehr stark ab. Wurde NADPH in einer Konzentration von nur 200 μM und CaM in einer Konzentration von 500 nM verwendet, war die [^{15}N]Nitrit-Bildung über einen linearen Bereich von 2 min annähernd gleich der, die bei Verwendung von 800 μM NADPH zu beobachten war. Nach 4 bzw. 10 min Inkubation waren die [^{15}N]Nitrit-Konzentrationen allerdings deutlich niedriger als in Gegenwart von 800 μM NADPH.

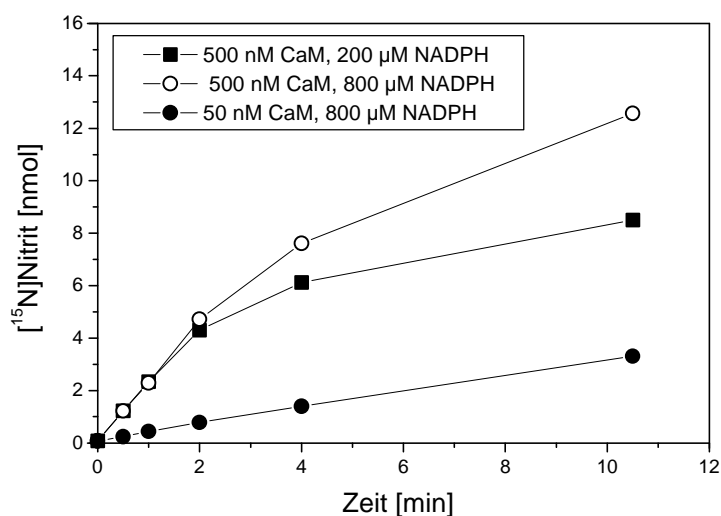


Abb. 17. Abhängigkeit der NOS-katalysierten Bildung von [^{15}N]Nitrit aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin von der Inkubationszeit. Die Proben (1 ml-Aliquots) in Puffer, der 100 μM L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin und alle Cofaktoren (0,2 oder 0,8 mM NADPH, 50 oder 500 nM CaM) enthielt, wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1,3 $\mu\text{g/ml}$ NOS pro Ansatz gestartet. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von Aceton gestoppt.

4.2.8.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität der neuronalen NOS

Unter den oben genannten Bedingungen war die gemessene NOS-Aktivität bis zu einer NOS-Konzentration von 26 $\mu\text{g/ml}$ linear von der eingesetzten NOS-Menge abhängig (Abb. 18). Die mittlere spezifische Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten neuronalen NOS betrug nach diesem Experiment $94 \text{ nmol } [^{15}\text{N}]\text{Nitrit} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

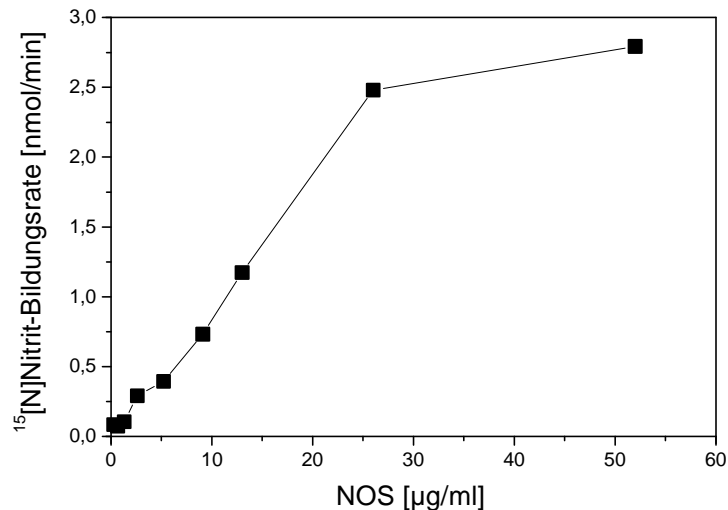


Abb. 18. Abhängigkeit der $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ -Bildungsrate aus $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ von der NOS-Konzentration. Die Ansätze mit allen Cofaktoren (hier 0,8 mM NADPH, 500 nM CaM) und $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ (100 μM) in Puffer wurden 10 min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe verschiedener NOS-Konzentrationen (0,26, 0,65, 1,3, 2,6, 5,2, 9,1, 13, 26 und 52 μg NOS pro ml) gestartet. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Aceton gestoppt.

4.2.8.4 Untersuchung der Wirkung der NOS-Inhibitoren L-NNA, L-NMA, L-NAME und SDMA auf die NOS-Aktivität

Abb. 19 zeigt, daß N^G -Nitro-L-Arginin (L-NNA), N^G -Methyl-L-Arginin (L-NMA), N^G -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), Asymmetrisches ($N^G, N^{G'}$ -) Dimethylarginin (ADMA) und Symmetrisches ($N^G, N^{G'}$ -) Dimethylarginin (SDMA) über die gesamte Inkubationszeit von 30 min in unterschiedlichem Maße die NOS-katalysierte Bildung von $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ aus $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ hemmen. Diese Abbildung zeigt auch, daß L-NNA der stärkste NOS-Inhibitor ist, gefolgt von ADMA, L-NMA, L-NAME und SDMA. In der Abwesenheit eines NOS-Inhibitors waren nach 30 min etwa 30 % des $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginins}$ zu $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ umgesetzt wor-

den. Die HPLC-Analyse (System A, Eluent B, 205 nm) eines 200 µl-Aliquots eines Ansatzes ohne Hemmstoff nach 30 min Inkubation zeigte, daß in dieser Probe zu diesem Zeitpunkt kein L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin mehr vorhanden war.

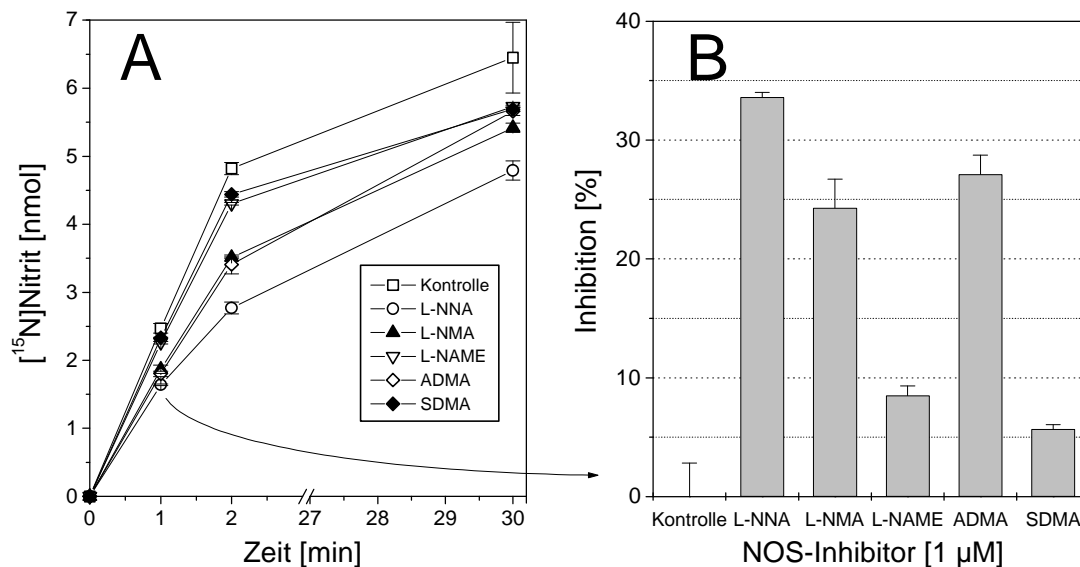


Abb. 19. **A:** Inhibition der NOS-katalysierten Bildung von [^{15}N]Nitrit aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin durch L-NNA, L-NMA, L-NAME, ADMA und SDMA. L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin (20 µM) wurde mit allen Cofaktoren und NOS für die angegebenen Zeiten in Abwesenheit (Kontrolle) und in Gegenwart der getesteten Inhibitoren (je 1 µM) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NOS (1,3 µg/ml Ansatz) gestartet. **B:** zeigt das Ausmaß der Inhibition der NOS-Aktivität durch die verschiedenen Inhibitoren, wie sie sich aus den nach einer Minute gemessenen [^{15}N]Nitrit-Bildungsraten in A errechnen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

4.2.8.5 Ermittlung enzymkinetischer Daten der ungehemmten und mit ADMA gehemmten NOS

Unter Verwendung verschiedener L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin-Konzentrationen und in Gegenwart verschiedener ADMA-Konzentrationen (0, 1, 5 bzw. 10 µM) wurde die enzymatische Bildung von [^{15}N]Nitrit aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin untersucht. Der Versuch wurde für jede ADMA-Konzentration in Mehrfachbestimmung (0 µM ADMA: n = 5; 1 µM ADMA: n = 3; 5 µM ADMA: n = 4; 10 µM ADMA: n = 3) durchgeführt. Dabei variierten die verwendeten L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin- und auch NOS-Konzentrationen (0,65 bzw. 0,325 µg/ml) in den einzelnen Versuchen. Die Inkubationszeit betrug bei allen Versuchen 2 min. Die [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten wurden in Relation zur eingesetzten NOS-Menge bestimmt. Mittels Hanes- bzw. Lineweaver-

Burk-Auftragung (Abb. 20, A und B, Quadrate) wurden K_m und V_{max} in Abwesenheit von ADMA bestimmt. Diese Werte betrugen 3,30 bzw. 3,01 μM für L-[$^{15}N_2$]Arginin und 0,205 bzw. 0,207 $\mu mol [^{15}N]Nitrit \cdot min^{-1} \cdot mg NOS^{-1}$.

Die Inhibitionskonstante K_i für die Hemmung der NOS durch ADMA wurde ebenfalls durch Hanes- (Abb. 20 A) und Lineweaver-Burk-Auftragungen (Abb. 20 B) für die verschiedenen ADMA-Konzentrationen ermittelt. Der Wert für K_i beträgt demnach $0,42 \pm 0,14$ bzw. $0,32 \pm 0,07 \mu M$ (Mittelwerte \pm SD, $n = 3$) für ADMA.

Unter Annahme einer kompetitiven Hemmung wurden für verschiedene L-[$^{15}N_2$]Arginin-Konzentrationen mit Hilfe der nach Hanes bzw. Lineweaver-Burk berechneten Werte für K_m , V_{max} und K_i die [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten berechnet. Die berechneten [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten waren mit Ausnahme der berechneten Kurve für 0 μM ADMA deutlich höher als die gemessenen, vor allem bei der niedrigsten ADMA-Konzentration von 1 μM (nicht gezeigt).

Das veranlaßte zu der Annahme, daß ADMA ein nicht-kompetitiver Inhibitor der NOS sein könnte. Aus diesem Grunde wurde mittels Hanes- bzw. Lineweaver-Burk-Auftragungen zusätzlich die zweite Inhibitionskonstante K_{ii} ($1,61 \pm 0,22$ bzw. $2,17 \pm 0,90 \mu M$, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$) von ADMA bestimmt und die [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten unter Annahme einer nicht-kompetitiven Hemmung berechnet.

In Abb. 20 C und D sind die entsprechenden Kurven, die unter Verwendung der nach Hanes bzw. Lineweaver-Burk ermittelten Konstanten erhalten wurden, zusammen mit den gemessenen Werten aufgetragen. Trotz der erheblichen Streuung der gemessenen Werte besteht eine gute Korrelation zwischen gemessenen und berechneten [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten. ADMA ist also sehr wahrscheinlich ein nicht-kompetitiver Inhibitor der NOS. Dafür spricht auch der Befund, daß sich die erhaltenen Geraden in beiden Auftragungsverfahren links von der y-Achse schneiden.

Typische GC-MS-Chromatogramme aus Analysen von Proben in den hier beschriebenen Experimenten sind in Abb. 21 dargestellt.

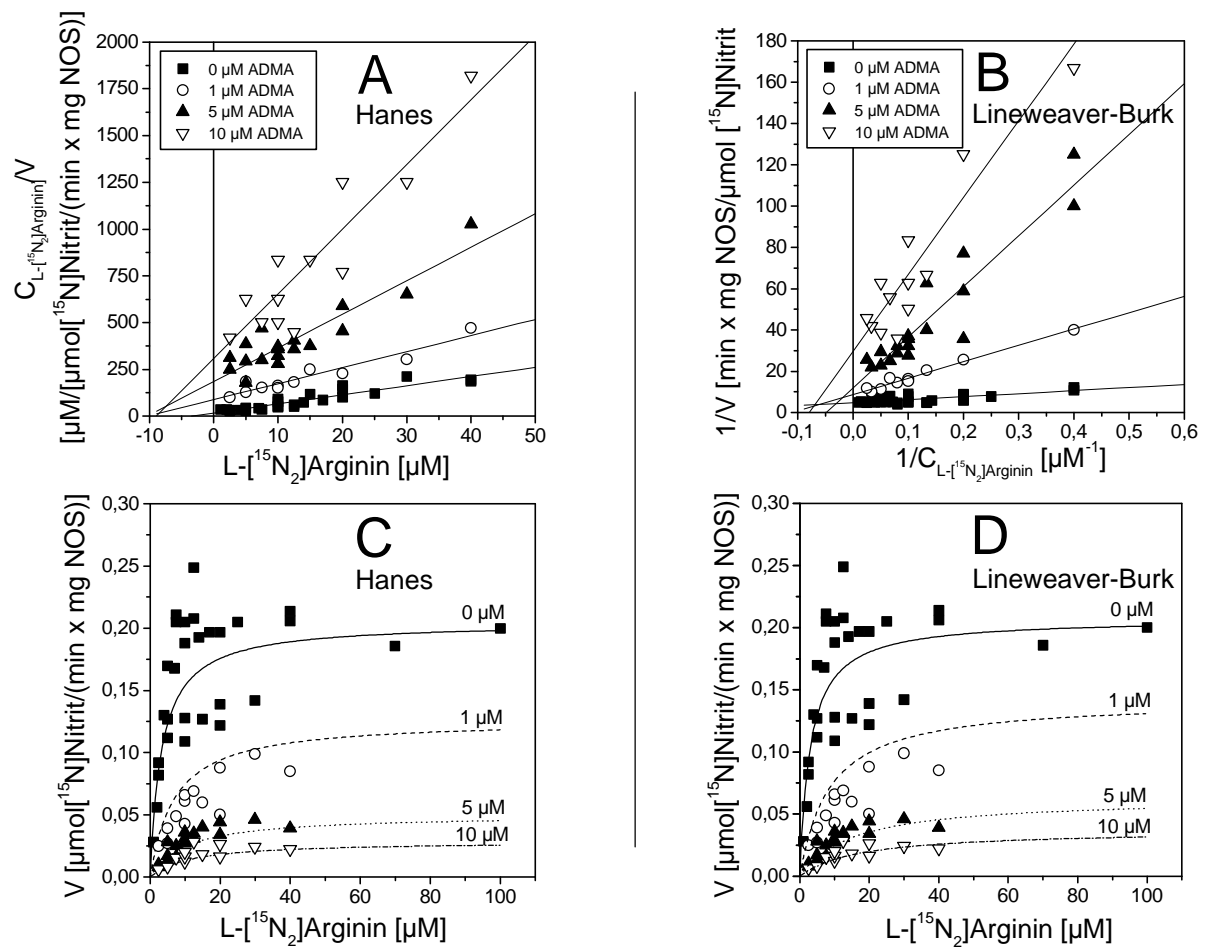


Abb. 20. (A) und (B): Hanes- und Lineweaver-Burk-Auftragungen der NOS-Aktivität, gemessen bei verschiedenen L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin-Konzentrationen (2,5-100 μM) in Gegenwart von ADMA (0, 1, 5 und 10 μM). Es wurde mit allen Cofaktoren und der entsprechenden ADMA-Konzentration für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NOS (6,5 oder 3,25 $\mu\text{g/ml}$) gestartet und nach 2 min durch Zugabe von Aceton gestoppt. [^{15}N]Nitrit wurde mittels GC-MS unter Verwendung von 2,5 μM [^{14}N]Nitrit als interner Standard quantifiziert. Die Gleichungen für die erhaltenen Regressionsgeraden lauten für Hanes: 0 μM ADMA: $y = 16,12 + 4,88 x$, $r = 0,926$; 1 μM ADMA: $y = 87,76 + 8,56 x$, $r = 0,956$; 5 μM ADMA: $y = 185,28 + 17,94 x$, $r = 0,916$; 10 μM ADMA: $y = 308,95 + 34,54 x$, $r = 0,913$ und für Lineweaver-Burk: 0 μM ADMA: $y = 4,82 + 14,52 x$, $r = 0,719$; 1 μM ADMA: $y = 8,78 + 79,25 x$, $r = 0,988$; 5 μM ADMA: $y = 11,97 + 245,38 x$, $r = 0,936$; 10 μM ADMA: $y = 29,74 + 371,78 x$, $r = 0,930$.

(C) und (D): Vergleich der unter Verwendung der Konstanten V_{\max} , K_M , K_i und K_{ii} berechneten [^{15}N]Nitrit-Bildungsgeschwindigkeiten mit den gemessenen Werten. In (C) wurden die mit Hilfe von (A) berechneten Konstanten (Hanes) eingesetzt. In (D) wurden die mit Hilfe von (B) berechneten Konstanten (Lineweaver-Burk) verwendet.

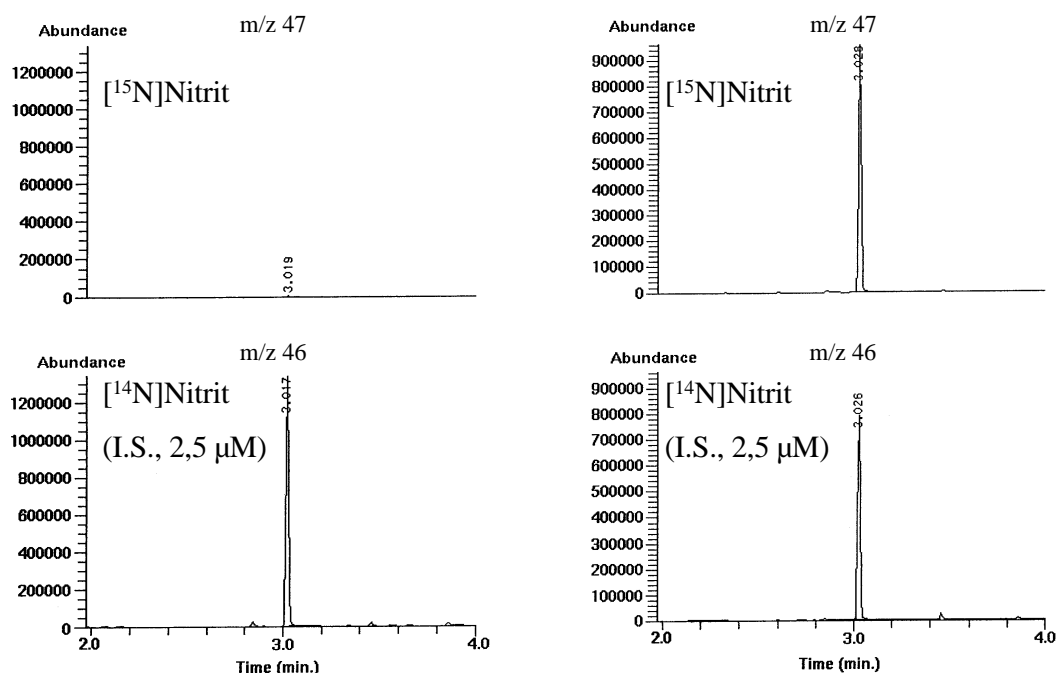


Abb. 21. Gegenüberstellung partieller GC-MS-Chromatogramme aus Analysen der NOS-katalysierten Bildung von $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ aus $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ in Gegenwart von allen Co-faktoren. Dargestellt sind Chromatogramme, wie sie aus Ansätzen mit 0 (links) und 40 μM $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ (rechts) erhalten wurden.

4.2.9 Trennung von $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ und GS^{15}NO in NOS-Ansätzen in Gegenwart von GSH

Um in NOS-Ansätzen GS^{15}NO neben $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ nachweisen zu können, mußten beide Substanzen vollständig voneinander getrennt werden. Wie bereits beschrieben wurde, ist HPLC-System A mit Eluent A nicht dazu geeignet, da es bei der Injektion aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Eluenten aus Nitrit und hohen Konzentrationen von GSH (3 mM) zur artifiziiellen GSNO-Bildung kommt. Das ist bei Verwendung von Eluent D (pH 7) und HPLC-System B nicht der Fall. Diese Analysen-Bedingungen haben allerdings den Nachteil, daß sowohl Nitrit als auch GSNO sehr kurze Retentionszeiten haben. Bei Inkubationen von NOS mit $\text{L}-[^{15}\text{N}_2]\text{Arginin}$ auch in Gegenwart von GSH ist mit sehr hohen $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ -Konzentrationen und nur sehr niedrigen GS^{15}NO -Konzentrationen zu rechnen. Es wurde daher untersucht, ob in Proben von GSH-haltigen, kompletten NOS-Ansätzen und einem hohen molaren Überschuß von $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ (40 μM) gegenüber GS^{15}NO (2 μM) eine vollständige Abtrennung von GS^{15}NO möglich ist. Zu diesem Zweck wurde eine solche Probe auf die HPLC (System

B, Eluent D) injiziert, 15 s HPLC-Fractionen gesammelt (0,3 ml), mit HgCl_2 (10 mM) versetzt und mittels GC-MS auf ^{15}N -Nitrit analysiert. Die Auftragung der Peakflächenverhältnisse von m/z 47 zu m/z 46 gegen die Retentionszeit führte zu einem Chromatogramm, bei dem ein sehr großer Peak bei 2 bis 3 min (^{15}N -Nitrit) und ein kleiner Peak bei der Retentionszeit von GS^{15}NO (3,5 min) auftraten. Die beiden Peaks waren deutlich voneinander getrennt. Das Verhältnis der Peakflächenverhältnisse von m/z 47 zu m/z 46 in den Fractionen von GS^{15}NO zu ^{15}N -Nitrit lag bei 0,067. Somit können GS^{15}NO -Konzentrationen unter diesen Bedingungen auch in Konzentrationen deutlich unter 2 μM in Gegenwart von hohen ^{15}N -Nitrit-Konzentrationen nachgewiesen werden. Eine exakte Quantifizierung von GS^{15}NO in NOS-Ansätzen ist mit dieser Methode nur dann möglich, wenn dem Eluenten oder den HPLC-Fractionen ein interner Standard von GS^{14}NO zugesetzt wird, da durch die Injektion relativ starke Schwankungen der ^{14}N -Nitrit-Konzentration im Eluenten auftreten können. Eine Verwendung des im frisch angesetzten Eluenten vorhandenen Nitrits (260 ± 30 nM, Mittelwert \pm SD, $n = 5$) als interner Standard wäre nur begrenzt möglich.

4.2.10 Quantifizierung von Hydroxylamin mittels GC-MS

Hydroxylamin (NH_2OH) wurde in wässrigen gepufferten Lösungen mittels GC-MS im NICI-Modus unter Verwendung von ^{15}N -markiertem Hydroxylamin ($^{15}\text{NH}_2\text{OH}$) als interner Standard nach Derivatisierung mit Pentafluoroacetophenon zum Oxim-Derivat wie folgt quantifiziert:

100 μl -Aliquots der zu analysierenden Lösungen wurden mit $^{15}\text{NH}_2\text{OH}$ als interner Standard (20 μM) versetzt und Methanol (400 μl), Pentafluoroacetophenon (10 μl) und *N,N*-Diisopropylethylamin (10 μl) zugesetzt. Die Reaktions-Ansätze wurden für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Methanol im Stickstoff-Strom entfernt und die Rückstände mit je 300 μl Toluol extrahiert. Die Oxim-Derivate von nicht-markiertem und ^{15}N -markiertem NH_2OH (je 1 mM in Puffer) wurden entsprechend hergestellt. Die Pentafluoroacetophenon-Derivate von Hydroxylamin traten nach GC-Trennung als zwei Peaks auf, die den syn- und anti-Isomeren der Oxim-Derivate entsprechen. Die intensivsten Massenfragmente waren m/z 190 ($[\text{M}-\text{CH}_3-\text{HF}]^-$) für nicht-markiertes und m/z 191 ($[\text{M}-\text{CH}_3-\text{HF}]^-$) für das ^{15}N -markierte Hydroxylamin.

Zur Quantifizierung von Hydroxylamin wurden 1 µl-Aliquots der Toluol-Extrakte auf die GC-Säule injiziert und mittels SIM bei m/z 190 für NH₂OH und m/z 191 für ¹⁵NH₂OH analysiert.

Es wurde eine Standardkurve in Puffer A für NH₂OH (0-100 µM) mit ¹⁵NH₂OH (20 µM) angefertigt. Die Lineare Regression zwischen gemessener (y) und zugegebener Konzentration (x) von NH₂OH ergab die Gleichung $y = 4,208 + 0,865 x$; $r = 0,997$.

Der mittlere Koeffizient *der intra-assay variation* betrug 4,6 % für NH₂OH. Das LOQ der Methode wurde auf 10 nM für den Haupt-Peak bestimmt. Der Variationskoeffizient betrug dabei 15 %.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Stabilität und NO-Freisetzung von S-Nitroso-Substanzen in pH-neutralen gepufferten wäßrigen Lösungen

SNC ist die reaktionsfreudigste bekannte physiologisch vorkommende S-Nitroso-Substanz und der stärkste NO-Donor unter den S-Nitroso-Substanzen. [64] SNC und andere S-Nitroso-Substanzen entfalten ihre physiologische Wirkung direkt oder durch Freisetzung von NO [64]. Die NO-Freisetzung aus S-Nitroso-Substanzen wird durch Kupfer-Ionen katalysiert. *In vivo* wie auch *in vitro* in wäßrigen Lösungen ist Cu¹⁺, dem die eigentliche katalytische Aktivität nachgesagt wird [23], instabil. Ziel der Untersuchungen im folgenden Abschnitt war es, den Einfluß von Cu²⁺ und Cystein auf die Stabilität von SNC und die NO-Freisetzung aus SNC aufzuklären. Diese Untersuchungen wurden in Puffer durchgeführt, da die NO-Freisetzung von SNC in Plasma aufgrund seines hohen Proteingehaltes nicht gemessen werden kann. Albumin ist das häufigste Protein im Plasma. Deshalb wurde in weitergehenden Versuchen der Einfluß von Albumin auf die NO-Freisetzung aus SNC erforscht. Da Albumin auch Cu²⁺ binden kann, wurde ferner geprüft, ob Albumin-gebundenes Cu²⁺ einen Einfluß auf die Stabilität von SNALB und SNC hat.

Desweiteren wurde die NO-Freisetzung aus S-Nitroso-Homocystein (SNhC) untersucht. Bei Patienten mit Gefäßerkrankungen wurden erhöhte Homocystein-Konzentrationen gemessen. Homocystein wird daher als Risikofaktor für Arteriosklerose diskutiert [143]. Es sollte geprüft werden, ob diese Krankheit mit einer möglichen Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen SNC und SNhC und der daraus resultierenden verringerten NO-Freisetzung im Plasma zusammenhängen könnte.

5.1.1 Einfluß von Cu^{2+} und Cystein auf die NO-Freisetzung aus SNC in Puffer A

In je 1 ml Puffer A wurden Lösungen von Cystein angesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SNC gestartet und die NO-Freisetzung mittels NO-Sensor gemessen. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Reaktionen von Cystein und CuSO_4 in Puffer A auf die gleiche Weise untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

In der Abwesenheit von Cystein und CuSO_4 setzte SNC die größte NO-Menge frei (Abb. 22). Mit steigenden Cystein-Konzentrationen nahm die maximale NO-Konzentration ab, und zwar sowohl in Abwesenheit (Abb. 22 A) als auch in Gegenwart von CuSO_4 (Abb. 22 B). Die Zeiten bis zur maximalen NO-Konzentration nahmen ebenfalls mit steigender Cystein-Konzentration in An- und Abwesenheit von CuSO_4 ab. In Abwesenheit von CuSO_4 nahmen die NO-Konzentrationen nach Erreichen ihrer Maxima mit steigenden Cystein-Konzentrationen langsamer ab. CuSO_4 (0,5 μM) führte zu einer Steigerung der maximalen NO-Konzentration, zu einer erheblichen Beschleunigung der NO-Freisetzung aus SNC und zu einer ebenfalls erheblich beschleunigten Abnahme der NO-Konzentration (Abb. 22 B). Zugabe von Cystein erniedrigte die Lebenszeit von NO konzentrationsabhängig. Erhöhung der CuSO_4 -Konzentration von 500 auf 1000 nM führte bei einer Cystein-Konzentration von 50 μM zu einer beschleunigten NO-Bildung, aber auch zu einem beschleunigten Abbau von NO (Abb. 22 C). Daß Cystein oder CuSO_4 die Stabilität von SNC sehr stark, die von NO aber kaum beeinflussen, konnte durch Inkubation von wäßrigen NO-Lösungen in Puffer A unter gleichen Bedingungen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Reaktionskinetische Untersuchungen ergaben, daß sich in Gegenwart von CuSO_4 (500 nM) und hohen Cystein-Konzentrationen (50 μM , 100 μM) die Kinetik des NO-Zerfalls in Puffer A von einer Kinetik zweiter Ordnung in eine Kinetik nullter Ordnung ändert. Die Zerfallsgeschwindigkeit von NO änderte sich dabei allerdings vergleichsweise unwesentlich. Die in Abb. 22 ersichtlichen Effekte von Cystein und CuSO_4

auf die NO-Halbwertzeiten sind also auf die durch Cystein verlangsamte und durch CuSO_4 beschleunigte NO-Freisetzung aus SNC zurückzuführen. Es ist deutlich, daß sich die Effekte von Cystein und CuSO_4 praktisch gegenseitig aufheben. Die Inkubation von SNC in Puffer A in Gegenwart von 1 mM HgCl_2 führte hingegen zu keiner NO-Freisetzung aus SNC, aber zur nahezu quantitativen Bildung von Nitrit (nicht gezeigt).

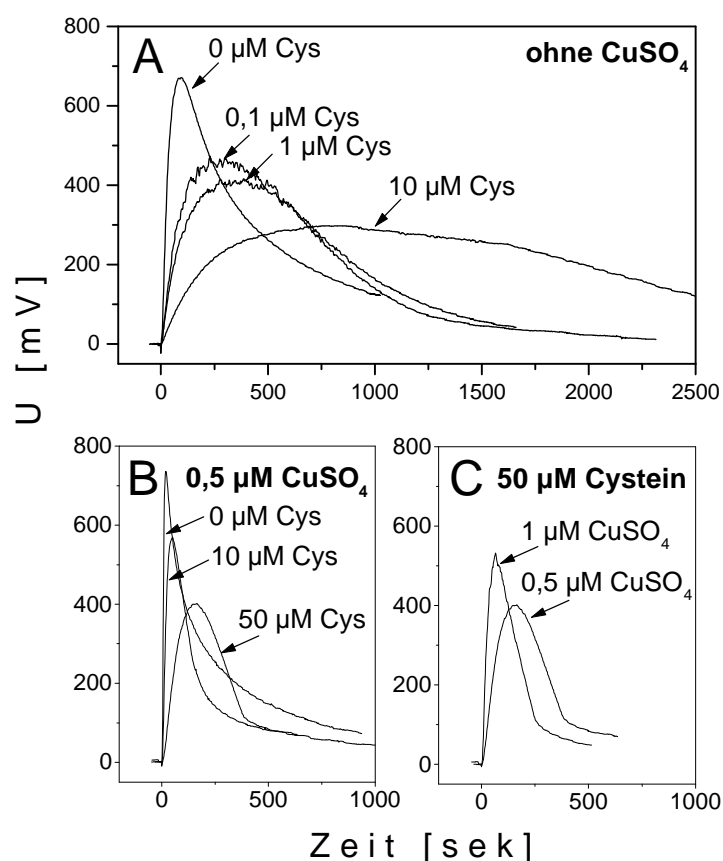


Abb. 22. NO-Freisetzung aus SNC (10 µM) in Puffer A (50 mM KH_2PO_4 , pH 7), gemessen mit einem NO-Sensor. (A) Der Puffer enthielt die angegebenen Cystein-Konzentrationen und kein CuSO_4 . (B) Der Puffer enthielt die angegebenen Cystein-Konzentrationen und 0,5 µM CuSO_4 . (C) Der Puffer enthielt 50 µM Cystein und 0,5 bzw. 1 µM CuSO_4 . SNC wurde allen Ansätzen in Form von 2,1 µl-Aliquots einer 4,8 mM Stammlösung zum Zeitpunkt $t = 0$ s zugegeben. *Hinweis:* Die NO-Bildung ist als Spannungszunahme angegeben, da eine genaue Quantifizierung nicht möglich ist (s. Kapitel 1.3). Als Maßstab für die NO-Freisetzung wurde bei jedem Experiment als Vergleich SNC in Puffer A inkubiert.

5.1.2 Einfluß von Cystein auf die Stabilität von SNC in Puffer A

In je 5 ml Puffer wurden Cystein-Lösungen von 0, 1, 2,5, 5, 7,5 und 10 µM angesetzt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von einer SNC-Stammlösung (9,52 mM), so daß SNC-Anfangskonzentrationen von 100 µM resultierten. Von den Proben wurden nach ver-

schiedenen Inkubationszeiten 200 µl-Aliquots genommen und auf die HPLC (System A, Eluent A) injiziert. Zur Quantifizierung von Nitrit wurden weitere 200 µl-Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, mit 20 µl 5 N HCl und 30 µl einer Cystein-Lösung (1 mM) versetzt und nach 5 min Inkubation in die HPLC injiziert. Als Standards für die SNC- und Nitrit-Quantifizierung dienten jeweils die 0 min-Proben. Am folgenden Tag (ca. 20 h) wurden weitere Proben entnommen und mittels GC-MS auf ihren Nitrit-Gehalt untersucht. Außerdem wurden von sämtlichen Proben erneut 200 µl-Aliquots entnommen und in die HPLC injiziert, um sicherzustellen, daß kein SNC mehr in den Ansätzen existierte. Cystein und Cystin wurden zu diesem Zeitpunkt durch Injektion von 200 µl-Aliquots der 1:3 mit dest. Wasser verdünnten Inkubations-Ansätze in die HPLC injiziert (Detektion bei 205 nm). In den Proben wurde ferner Hydroxylamin mittels GC-MS bestimmt.

Abb. 23 zeigt, daß SNC in der Abwesenheit von Cystein bereits nach 10 min nicht mehr nachweisbar war, während die Nitrit-Konzentration nach dieser Zeit schon 90 µM betrug. Cystein bewirkte in einer Konzentration von nur 1 µM eine drastische Steigerung der SNC-Stabilität, die sich in einer verminderten Nitrit-Bildung äußerte. Eine weitere Steigerung der Cystein-Konzentration von 1 auf 10 µM bewirkte eine verhältnismäßig schwache weitere Stabilisierung von SNC, aber eine deutliche Verminderung der Nitrit-Bildung. Nach 20 h konnte in keinem Ansatz noch intaktes SNC gemessen werden.

Abb. 24 zeigt die Konzentrationen der untersuchten Substanzen nach einer Inkubationszeit von ca. 20 h im selben Experiment. In der Abwesenheit von Cystein betrug die Nitrit-Konzentration ca. 90 µM entsprechend einer Ausbeute von ca. 90 %. Steigende Cystein-Konzentrationen bewirkten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Nitrit-Konzentration (Abb. 24, links). Hydroxylamin, ein mögliches Produkt von S-Nitroso-Substanzen [144], war in allen Ansätzen in sehr kleinen Konzentrationen zu messen. Seine Bildung zeigte keine deutliche Abhängigkeit von der Cystein-Konzentration. Die Abnahme der Nitrit-Konzentration mit steigender Cystein-Konzentration kann durch die Bildung von Hydroxylamin nicht erklärt werden. Welche anderen stickstoffhaltigen Reaktionsprodukte von SNC entstanden sind, wurde nicht untersucht. Cystin konnte in der Probe, in der kein Cystein extern zugegeben worden ist, nur in sehr kleinen Konzentrationen gemessen werden (Abb. 24, rechts). Das heißt, daß aus SNC in Abwesenheit von Cystein kein Cystin entsteht. Die konzentrationsabhängige Bildung von Cystin weist darauf hin, daß dieses Cystin ausschließlich aus dem extern zugesetzten Cystein und nicht aus SNC stammt.

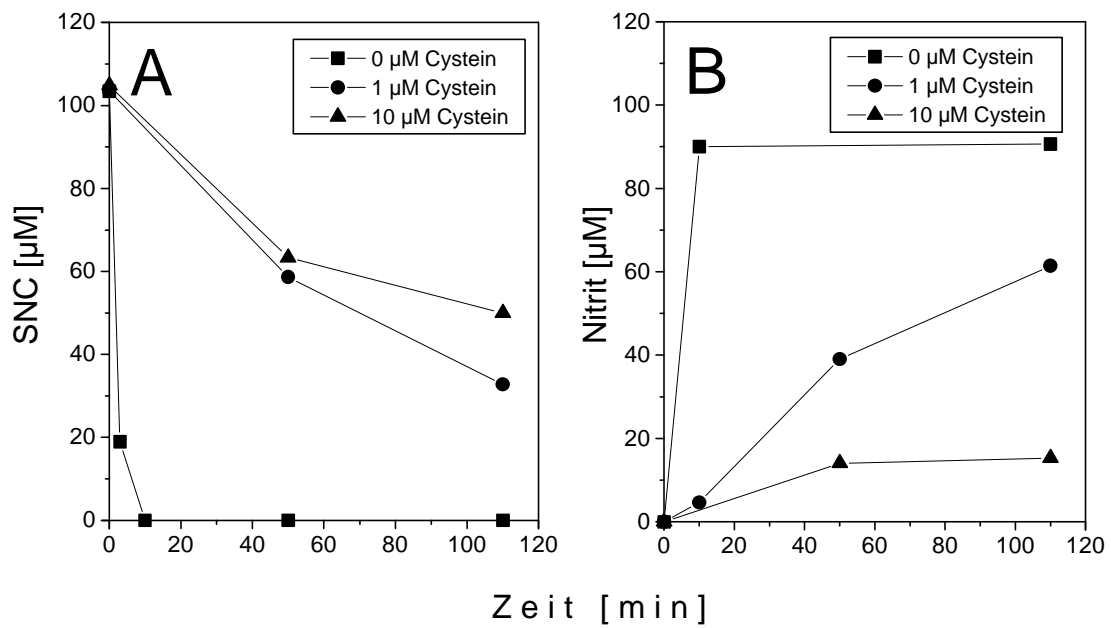


Abb. 23. Zeitlicher Verlauf des SNC-Zerfalls (A) und der Nitrit-Bildung (B) bei der Inkubation von 100 µM SNC in Puffer A als Funktion der Cystein-Konzentration.

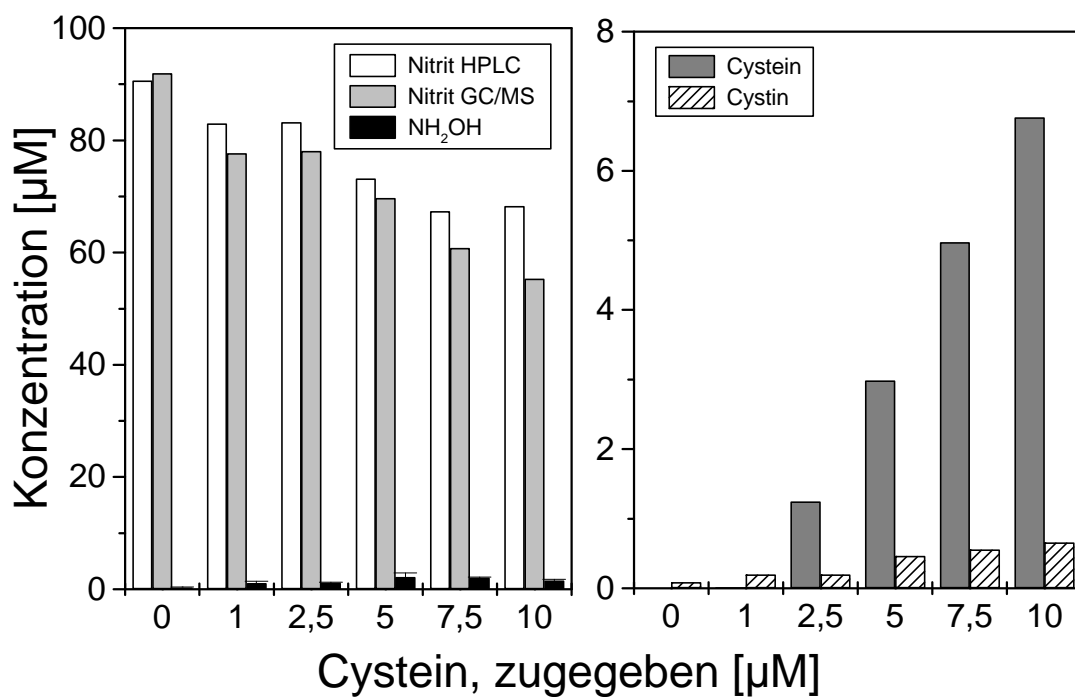


Abb. 24. Konzentration von Nitrit und Hydroxylamin (links) sowie Cystein und Cystin (rechts) nach 20 h Inkubation von 10 µM SNC in Puffer A in Gegenwart der angegebenen Cystein-Konzentrationen.

5.1.3 Vergleich der NO-Freisetzung aus SNC, GSNO, SNAC und SNALB in Puffer A

Je 20 μM SNC, GSNO, SNAC, SNhC und SNALB wurden separat zu Puffer A (1 ml) gegeben und die NO-Freisetzung mit dem NO-Sensor gemessen. Nur SNC führte dabei zu einer meßbaren Bildung von NO (nicht gezeigt).

5.1.4 NO-Freisetzung aus SNC in Puffer A in Gegenwart von HSA

SNC wurde in Gegenwart von HSA (0,1-10 μM) inkubiert und die NO-Freisetzung gemessen. In einem Versuch wurden 10 μM HSA erst 7 s nach der SNC-Zugabe zum Ansatz zugegeben. Die Gegenwart von HSA führte zu einer konzentrationsabhängigen, ausgeprägten Verringerung der NO-Freisetzung aus SNC (Abb. 25). Bereits 0,1 μM HSA, also ein 10-facher molarer Unterschuß von HSA gegenüber SNC, führte zu einer Verringerung der maximalen NO-Konzentration im Ansatz (in mV) um 54 %. Die maximale NO-Konzentration wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt (65 s) erreicht als in Abwesenheit von HSA (37 s). Bereits 1 μM HSA führte zu einer 86%igen Verringerung der maximalen NO-Konzentration. Das Maximum trat hier zeitlich stark verzögert auf (300 s). In Gegenwart von 10 μM HSA konnte schließlich kein NO mehr detektiert werden. Die Zugabe von HSA (10 μM) erst 7 s nach der SNC-Zugabe führte (nach vollständigem Durchmischen des Ansatzes) zu einer abrupten Beendigung der NO-Freisetzung aus SNC. Der Zerfall des bereits entstandenen NO wurde durch HSA offenbar nicht beeinflusst (Abb. 25).

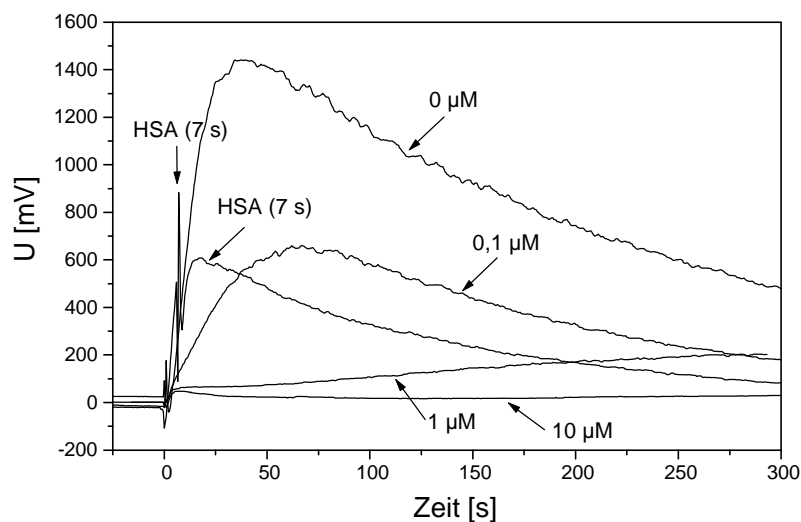


Abb. 25. Messung der NO-Freisetzung bei der Inkubation von SNC (1 μM) in Puffer A, der die angegebenen HSA-Konzentrationen enthielt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SNC in den HSA-haltigen Puffer A gestartet. Die mit senkrechtem Pfeil markierte Kurve wurde erhalten, indem HSA (10 μM) erst 7 s nach der Zugabe von SNC zugesetzt worden ist. *Hinweis:* Die im Vergleich zu anderen Experimenten sehr starken NO-Signale für 1 μM SNC sind auf die Verwendung einer neuen NO-Elektrode zurückzuführen.

In einem weiteren Versuch wurde SNC in Puffer A mit HSA in Gegenwart verschiedener Cystein-Konzentrationen inkubiert und die NO-Bildung registriert. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt. 0,1 μM HSA führte bei einer Cystein-Konzentration von 1 μM zu einer verlangsamt NO-Freisetzung aus SNC (3), verglichen mit einem Ansatz, der kein HSA enthielt (2). Die maximale NO-Konzentration war nur geringfügig niedriger. Auch dauerte in Gegenwart von 0,1 μM HSA (3) die NO-Freisetzung länger an als in Abwesenheit von HSA (2). Die Erhöhung der Cystein-Konzentration auf 10 μM bei einer HSA-Konzentration von 0,1 μM (5) führte zu einer erheblichen Verzögerung und Verringerung der NO-Freisetzung aus 1 μM SNC. Die Erhöhung der HSA-Konzentration auf 1 μM bei einer Cystein-Konzentration von 10 μM (6) führte zu einer geringeren maximalen NO-Konzentration und zu einer verzögerten, aber länger andauernden NO-Freisetzung im Vergleich zur Probe, die nur 0,1 μM HSA und 10 μM Cystein (5) enthielt. Lag in der Probe 1 μM HSA aber gar kein Cystein vor (4), führte das zu einer beschleunigten, verstärkten und verlängerten NO-Freisetzung im Vergleich zu Proben, die zusätzlich 10 μM Cystein enthielten (6).

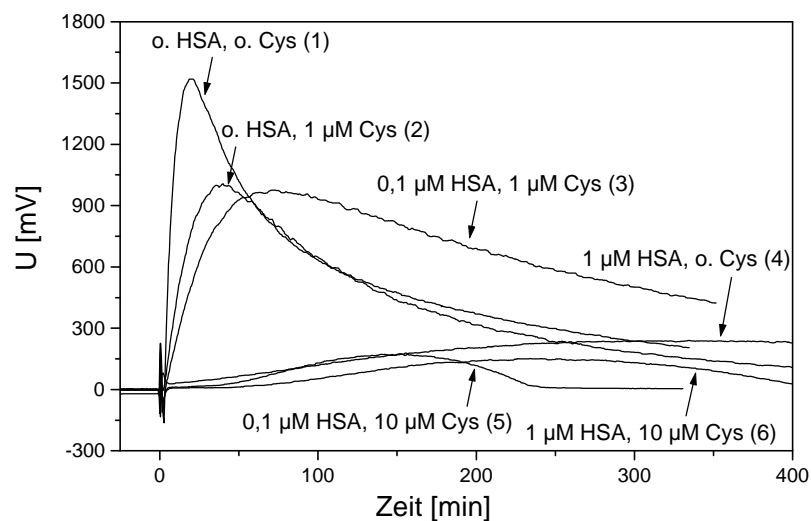


Abb. 26. NO-Freisetzung bei der Inkubation von SNC (1 μM) in Puffer A, der die angegebenen HSA- und Cystein-Konzentrationen enthielt. o. HSA und o. Cys bedeuten: ohne HSA bzw. ohne Cystein.

Folglich führt HSA zu einer Verlängerung der Dauer der NO-Freisetzung aus SNC und einer Verringerung der maximalen NO-Konzentration, ohne daß die Gesamtausbeute an NO aus SNC, die sich in der Fläche unter der Kurve ausdrückt, dabei wesentlich verringert wird. Ist

Cystein vorhanden, so wird die Gesamtausbeute an NO sogar durch HSA wesentlich erhöht (Vergleiche hierzu die Kurven (2) und (3) bzw. (5) und (6) in Abb. 26).

5.1.5 Vergleich der NO-Freisetzung aus SNC und SNhC in Puffer

Die Inkubation von SNhC (20 μM) in Puffer A in Abwesenheit von CuSO_4 und Cystein führte zu praktisch keiner meßbaren NO-Bildung (nicht gezeigt). Die aus SNC und SNhC erhaltenen Verläufe der NO-Bildung in Gegenwart von CuSO_4 und Cystein sind in Abb. 27 dargestellt.

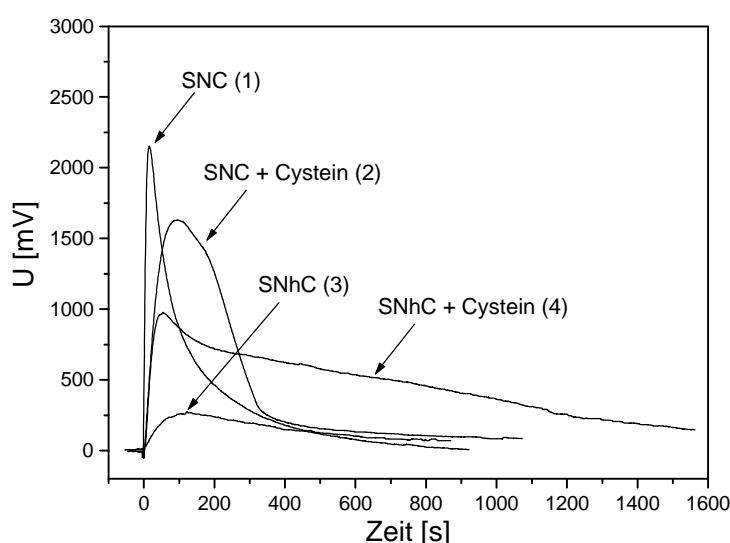


Abb. 27. NO-Freisetzung aus SNC und SNhC (je 20 μM) in Puffer A in Gegenwart von CuSO_4 (500 nM). In den Cystein-haltigen Ansätzen betrug die Cystein-Konzentration 40 μM .

Während die Inkubation von SNC in Puffer A in Abwesenheit von Cystein zu einer sehr schnellen, starken, aber kurz anhaltenden NO-Freisetzung führte (1), war die entsprechende NO-Freisetzung aus SNhC zwar vergleichbar kurz anhaltend, aber die Geschwindigkeit der NO-Freisetzung war deutlich langsamer (3). Die maximale NO-Konzentration in diesem Ansatz war um 87,5 % niedriger als im gleichen Ansatz mit SNC (1). Wurde SNhC in Puffer A in Gegenwart von Cystein inkubiert, so führte das zu einer erheblich schnelleren und länger anhaltenden Freisetzung von NO (4) als in Abwesenheit von Cystein (3). Auch die maximale NO-Konzentration im Ansatz war nur um 55 % geringer als im Ansatz mit SNC ohne Cystein (1). Es fällt auf, daß die NO-Freisetzung aus SNhC in Gegenwart von Cystein (4) etwa genauso schnell verläuft wie die aus SNC in Gegenwart von Cystein (2). Die maximale NO-Konzentration im Ansatz von SNC mit Cystein (2) ist um 67 % höher als im Ansatz von

SNhC mit Cystein (3). Die Dauer der NO-Freisetzung im SNhC/Cystein-Ansatz ist aber deutlich länger als im SNC/Cystein-Ansatz. Die in der gesamten Inkubationszeit freigesetzte NO-Menge scheint somit im SNhC/Cystein-Ansatz sogar um 56 % größer zu sein als im SNC/Cystein-Ansatz (nach Integration der Flächen unter den Kurven).

5.1.6 Einfluß von Albumin- bzw. SNALB-gebundenem Cu^{2+} auf die Reaktion von S^{15}NALB zu $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$

Aus je 6 ml Plasma wurden je ca. 6 ml S^{15}NALB - bzw. Albumin-Standard hergestellt. Je 2,5 ml dieser Standards wurden in Gegenwart von 1 mM CuSO_4 für 10 min inkubiert und über je eine mit Puffer A vorkonditionierte Sephadex PD10-Säule extrahiert. Die Eluate wurden anschließend erneut über 5 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen extrahiert. Zur vollständigen Entfernung von freiem Cu^{2+} wurden die Kartuschen vor der Elution mit je 100 ml Puffer A gespült. Anschließend erfolgte das Einengen der beiden Eluate auf je ca. 1 ml.

Je ein 50 μl -Aliquot des mit Cu^{2+} behandelten S^{15}NALB -Standards ($\text{Cu-S}^{15}\text{NALB}$) wurde in Puffer A in An- und Abwesenheit von Cystein für 2 min bei RT inkubiert. Ferner wurde auf die gleiche Weise je ein 50 μl -Aliquot des S^{15}NALB -Standards allein und zusammen mit 50 μl -Aliquots des mit Cu^{2+} behandelten Albumin-Standards (Cu-ALB) bzw. des Albumin-Standards (ALB) inkubiert. Die Proben-Volumina betrugen jeweils 500 μl . Den Ansätzen wurde als interner Standard 10 μM $[\text{N}^{14}]\text{Nitrit}$ zugesetzt. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von je zwei 100 μl -Aliquots zu einer Lösung von 10 μl PFB-Br in 400 μl Aceton. Die Proben wurden für je 5 min bei RT derivatisiert und die $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$ -Konzentration mittels GC-MS gemessen. In den Ultrafiltraten aller vier Standards von S^{15}NALB und ALB wurde die Konzentration von freiem Cu^{2+} gemessen. In keiner der Ansätze konnte freies Cu^{2+} gemessen werden.

In Abb. 28 sind die in den einzelnen Ansätzen gemessenen $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$ -Konzentrationen dargestellt. In sämtlichen Proben, die kein Cystein enthielten, betrug die Konzentration von $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$ ca. 1 μM . Die $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$ -Konzentration in den Proben, die kein Protein-gebundenes Cu^{2+} enthielten (bzw. nur Cu^{2+} endogenen Ursprungs), war auch nach der Inkubation in Gegenwart von Cystein nur unwesentlich größer als 1 μM . Enthielten die Cystein-haltigen Proben jedoch Protein-gebundenes Cu^{2+} , so wurden erheblich höhere $[\text{N}^{15}]\text{Nitrit}$ -Konzentrationen gemessen. Es spielt dabei offenbar keine Rolle, ob das Cu^{2+} zum Teil an

$S^{15}\text{NALB}$ selbst oder ausschließlich an Albumin gebunden ist. Die $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ -Ausbeuten in diesen Proben betrugen bereits nach 2 min Inkubation 37 % ($\text{Cu-}S^{15}\text{NALB}$) bzw. 34 % ($S^{15}\text{NALB} + \text{Cu-ALB}$). Dieses Ergebnis zeigt, daß an Albumin bzw. $S^{15}\text{NALB}$ gebundenes Cu^{2+} bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cystein die Stabilität von $S^{15}\text{NALB}$ stark herabsetzt. Die Bildung von Nitrit ist ein Maß für die Freisetzung von NO .

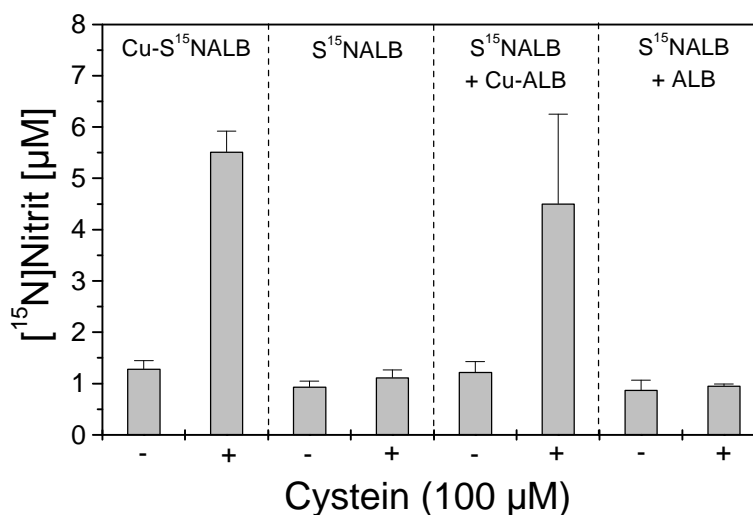


Abb. 28. Einfluß von Protein-gebundenem Cu^{2+} auf die Bildung von $[^{15}\text{N}]\text{Nitrit}$ aus $\text{Cu-}S^{15}\text{NALB}$ und $S^{15}\text{NALB}$ in Puffer A. Die Inkubationszeit betrug jeweils 2 min. Die Konzentration von $\text{Cu-}S^{15}\text{NALB}$ betrug in den entsprechenden Ansätzen 15 µM, die von $S^{15}\text{NALB}$ 13 µM. Zur Herstellung der Standards siehe Text. Die Protein-Konzentration der Standards betrug ca. 300 µM.

5.2 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in wäßrigen gepufferten Lösungen

In einer vorangegangenen Arbeit [48] wurden Gleichgewichtskonstanten (K_{eq}) von einigen S-Transnitrosylierungs-Reaktionen ermittelt. Zum damaligen Zeitpunkt war es noch nicht möglich, auch Reaktionen zu untersuchen, an denen Albumin/ $S^{15}\text{NALB}$ beteiligt sind. Gerade solche Reaktionen sind für die vorliegende Arbeit jedoch von besonderem Interesse. Zusätzlich wurde geprüft, ob bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen NO und weitere mögliche Produkte von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen (wie z.B. Disulfide oder Hydroxylamin) gebildet werden, um den Mechanismus dieser Reaktion aufzuklären.

5.2.1 NO-Bildung bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen

Abb. 29 zeigt, daß GSNO in Tris-Puffer im Gegensatz zu SNC kein NO freisetzt. Zugabe von SNC (20 µM) zu einer Lösung von GSH (1 mM) im selben Puffer führte zu keiner detektierbaren NO-Freisetzung. Zugabe von GSNO (20 µM) zu einer Cystein-Lösung (1 mM) führte hingegen zu einer geringfügigen, aber deutlichen und lang anhaltenden NO-Freisetzung. Es muß daher angenommen werden, daß die dabei gemessene NO-Freisetzung auf die SNC-Bildung durch S-Transnitrosylierung von GSNO mit Cystein zurückzuführen ist (Cystein + GSNO \rightleftharpoons SNC + GSH).

Inkubation von SNC (20 µM) mit 1 mM NAP führte zu einer recht ausgeprägten NO-Freisetzung (Abb. 29), obwohl SNAP eine recht stabile S-Nitroso-Substanz ist. Dieses überraschende Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Versuchen (s. Kapitel 5.2.7 und 5.2.8).

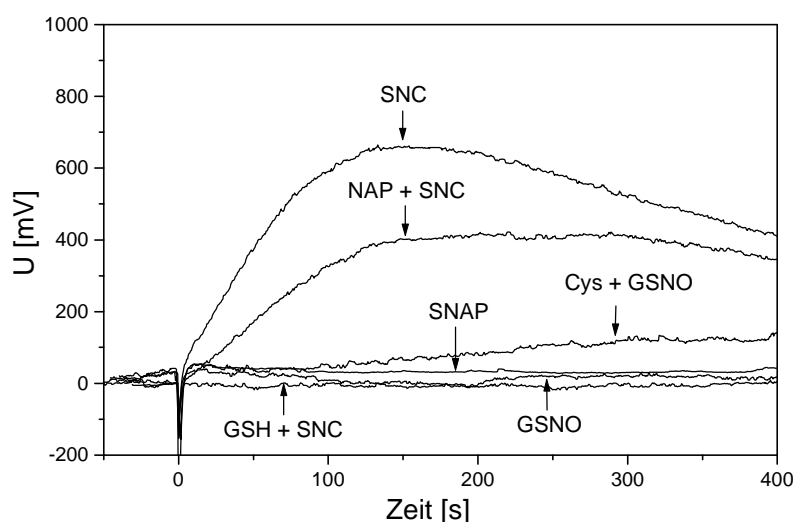


Abb. 29. NO-Freisetzung aus SNC, GSNO und SNAP sowie bei den S-Transnitrosylierungs-Reaktionen GSH + SNC, Cys + GSNO und NAP + SNC in Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,4). SNC und GSNO wurden in Konzentrationen von 20 µM eingesetzt, die Konzentrationen der Thiole Cys, GSH und NAP betrugen 1 mM. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der S-Nitroso-Substanz gestartet.

Inkubation von SNALB (8 µM) in Gegenwart von Cystein (100 µM) führte zu einer geringfügigen Freisetzung von NO, während SNALB allein zu keiner meßbaren NO-Freisetzung führte (nicht gezeigt). Auch in diesem Falle muß angenommen werden, daß die gemessene NO-Freisetzung auf die intermediäre Bildung von SNC zurückzuführen ist. Auch mit Hilfe

von ^{14}C -markiertem Cystein (s. 5.2.5) konnte bei Reaktionen von SNALB mit Cystein kein SNC gemessen werden.

5.2.2 Bildung von Hydroxylamin aus Angeli's Salz und in S-Transnitrosylierungs-Reaktionen

Angeli's Salz ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) ist ein NO^- - und NO^- -Donor [145]. NO^- reagiert weiter zu NH_2OH , so daß die Bildung von NH_2OH als Indikator für das direkt nicht detektierbare NO^- gilt. Angeli's Salz diente in diesen Untersuchungen als NO^- -Donor und sollte helfen nachzuweisen, ob NO^- bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen gebildet wird. Inkubation von Angeli's Salz in Tris-Puffer führte zu einer konzentrationsabhängigen Bildung von Nitrit und NH_2OH (Abb. 30 A).

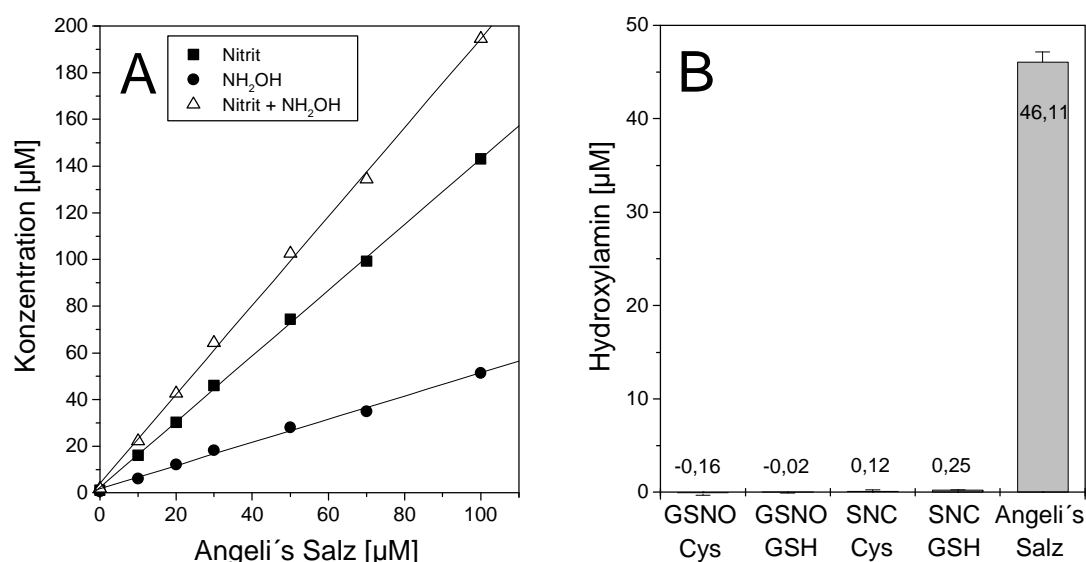


Abb. 30. Bildung von NH_2OH aus Angeli's Salz und bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,4). (A) Quantifizierung von Nitrit und Hydroxylamin mittels GC-MS nach Inkubation von 0-100 μM Angeli's Salz in Puffer A. (B) Quantifizierung von NH_2OH mittels GC-MS bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen von GSNO mit Cys, GSNO mit GSH, SNC mit Cys und SNC mit GSH in Tris-Puffer im Vergleich zur Inkubation von Angeli's Salz. Die Inkubationszeiten betrugen jeweils 10 min. S-Nitroso-Substanzen und Angeli's Salz wurden in Konzentrationen von je 100 μM , die Thiole in Konzentrationen von je 500 μM eingesetzt.

Lineare Regression zwischen gemessenem Nitrit bzw. NH_2OH (y) und initialer Angeli's-Salz-Konzentration (x) führte zu den Regressions-Gleichungen $y = 2,24 + 1,41 x$ ($r^2 = 0,999$) für

Nitrit und $y = 1,74 + 0,49 \times (r^2 = 0,995)$ für NH_2OH . Diese Ergebnisse zeigen, daß Angeli's Salz bei pH 7,4 fast vollständig zu Nitrit und NH_2OH zerfällt, wobei Nitrit das Hauptprodukt dieser Reaktion ist. Im Gegensatz dazu kam es in S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in keinem der untersuchten Fälle zu einer mittels GC-MS detektierbaren NH_2OH -Bildung (Abb. 30 B). NO^- wurde also bei den untersuchten S-Transnitrosylierungs-Reaktionen nicht gebildet.

5.2.3 S-Transnitrosylierung von GSH durch [^{14}C]SNC

Es wurde eine Lösung von 500 μM GSH und 700 μM DTPA in Puffer A hergestellt. Dazu wurden 20 μM SNC und 2615 cpm [^{14}C]SNC zugegeben. Das Volumen des Ansatzes betrug 250 μl . Nach 3 h wurde ein 200 μl -Aliquot mit dem HPLC-System A (Eluent A) analysiert. Die Analyse erfolgte mittels UV-Detektion bei 333 nm. Ferner wurden über 15 min 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen. Die GSNO-Konzentration betrug laut UV-Signal 18,7 μM . Die Gesamtaktivität aller gesammelten 1 min-HPLC-Fractionen betrug 1783 cpm. Die HPLC-Fractionen mit der Retentionszeit von Cystein hatten eine Gesamtaktivität von 1242 cpm. Demnach beträgt der Anteil von [^{14}C]Cystein an der eluierten Aktivität 70 %. Die HPLC-Fractionen mit den Retentionszeiten von SNC und Cystin hatten keine deutlich über dem Rauschen liegende Aktivität. Demnach hat die S-Transnitrosylierungs-Reaktion von SNC mit einem hohen molaren Überschuß von GSH fast quantitativ (93,5 %) zur Bildung von GSNO geführt. [^{14}C]SNC und SNC haben dabei fast ausschließlich zu [^{14}C]Cystein, Cystein und GSNO reagiert.

5.2.4 S-Transnitrosylierung von nicht markiertem Cystein durch [^{14}C]SNC

SNC wurde in Gegenwart von Cystein, [^{14}C]Cystein und 700 μM DTPA für 5 min in Puffer A inkubiert. Anschließend erfolgte die HPLC-Analyse. Es wurden über 15 min 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen. Die Auftragung der Aktivitäten der 1 min-Fractionen gegen die Retentionszeit führte zum in Abb. 31 dargestellten Aktivitäts-Profil. Es ist zu erkennen, daß neben dem Peak bei einer Retentionszeit von 4 min ([^{14}C]Cystein) auch ein Peak mit der Retentionszeit von SNC (8 min) auftritt. Das bedeutet, daß eine S-Transnitrosylierungs-Reaktion auch zwischen einer S-Nitroso-Substanz und dem korrespondierenden Thiol stattfindet.

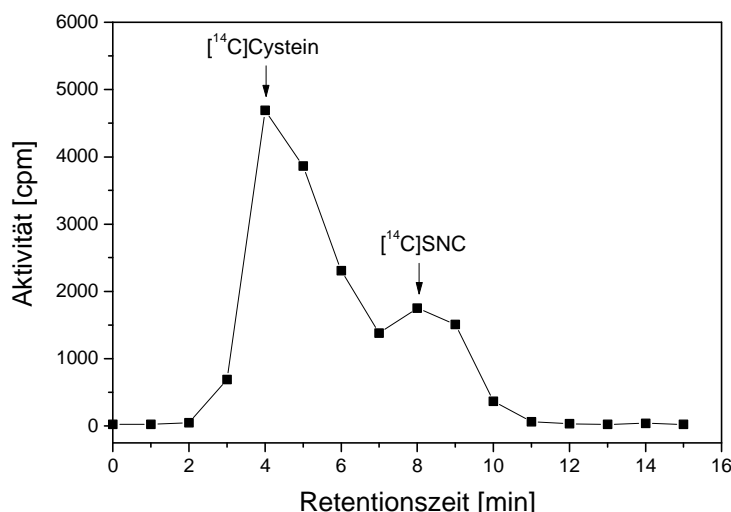


Abb. 31. Radiogramm aus der HPLC-Analyse eines Gemisches aus 100 μM SNC, 100 μM Cystein und [^{14}C]Cystein (24748 cpm) in Gegenwart von 700 μM DTPA in Puffer A nach 5-minütiger Inkubation. Es wurden 200 μl (19799 cpm) in die HPLC (System A, Eluent A) injiziert und 1 min-Fractionen gesammelt. Anschließend wurde die Radioaktivität in den 1 min-Fractionen gemessen.

5.2.5 Reaktion von SNALB mit Cystein in Gegenwart von [^{14}C]Cystein

S¹⁵NALB wurde in Puffer A mit Cystein, [^{14}C]Cystein und DTPA für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte Ultrafiltration durch Zentrifugation und die HPLC-Analyse des Ultrafiltrates. Es wurden 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen. Abb. 32 zeigt das Aktivitätsprofil. Das Fehlen nennenswerter Aktivität in der Fraktion mit der Retentionszeit von SNC zeigt, daß kein oder kaum [^{14}C]SNC gebildet wurde, obwohl der hohe Überschuß an Cystein theoretisch zu einer nahezu quantitativen S-Transnitrosylierung von [^{14}C]Cystein durch S¹⁵NALB unter Bildung von [^{14}C]SNC führen sollte. Da die Anfangskonzentration von S¹⁵NALB und Cystein 20 bzw. 200 μM betrug, hätte etwa 10 % der Gesamtaktivität der HPLC-Fractionen in der Fraktion mit der Retentionszeit von SNC (8 min) zu finden sein müssen. Die Analyse des Ultrafiltrations-Rückstandes (Proteinfraktion) mittels Saville-Methode zeigte kein Vorhandensein von S-Nitroso-Substanzen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit vergleichbaren Versuchen unter Verwendung von nicht-markiertem Cystein, bei denen ebenfalls kein SNC meßbar war. Die Inkubation von 8 μM SNALB in 100 μM Cystein in Puffer A führte hingegen zu einer Freisetzung von NO, die mit dem NO-Sensor detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

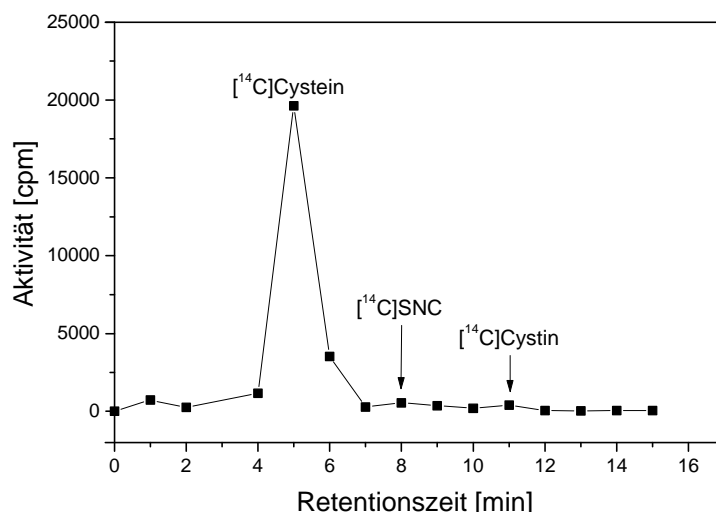


Abb. 32. Radiogramm aus der HPLC-Analyse eines Gemisches aus 20 μM S^{15}NALB , 200 μM Cystein, [^{14}C]Cystein (72576 cpm) und 700 μM DTPA in Puffer A. Nach einer Inkubationszeit von 5 min und Ultrafiltration (2 min, 1200 g, 4°C) wurde ein 200 μl -Aliquot (14515 cpm) des Ultrafiltrates in die HPLC (System A, Eluent A) injiziert, 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen.

5.2.6 Reaktion von SNP mit Cystein in Gegenwart von [^{14}C]Cystein bzw. mit GSH und NAC

Eine Lösung (1 ml) von Cystein (10 mM), [^{14}C]Cystein (138298 cpm) und DTPA (700 μM) in Puffer A wurde mit SNP versetzt, so daß eine initiale Konzentration von 5 mM im Ansatz vorlag. Nach 0,5, 20, 165 und 283 min wurden 200 μl -Aliquots entnommen und mittels HPLC (System A, Eluent A) analysiert. Es wurde das UV-Signal bei 333 nm gemessen, für jeweils 20 min 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen.

In zwei weiteren Ansätzen wurden statt Cystein und [^{14}C]Cystein Lösungen von GSH (10 mM) und NAC (10 mM) mit SNP (5 mM) inkubiert und mittels HPLC analysiert. In keinem der Ansätze und zu keinem Zeitpunkt konnte mittels UV-Detektion eine Bildung von SNC, GSNO bzw. SNAC detektiert werden. In dem Ansatz mit Cystein und [^{14}C]Cystein konnte ebenfalls zu keinem Zeitpunkt [^{14}C]SNC in Form einer deutlich erhöhten Aktivität der 1 min-Fraktion mit der Retentionszeit von SNC (8 min) detektiert werden (Abb. 33). Anhand der Radiogramme konnte nur eine geringfügige Erhöhung der Cystin-Konzentration im Laufe der Inkubationszeit gemessen werden, die allerdings allein mit der Autooxidation von Cystein zu Cystin erklärt werden könnte. Die Abnahme der Aktivitäten in den 1 min-Fractionen mit der Retentionszeit von Cystein (5 min) bzw. die Verfärbung aller Ansätze über rosa nach

braun im Laufe der Inkubationszeit zeigt, daß eine Reaktion zwischen Thiolen mit SNP zu unbekannten Produkten stattgefunden haben muß. Diese Reaktionen liefen in Ansätzen mit Cystein, gefolgt von GSH, am schnellsten ab.

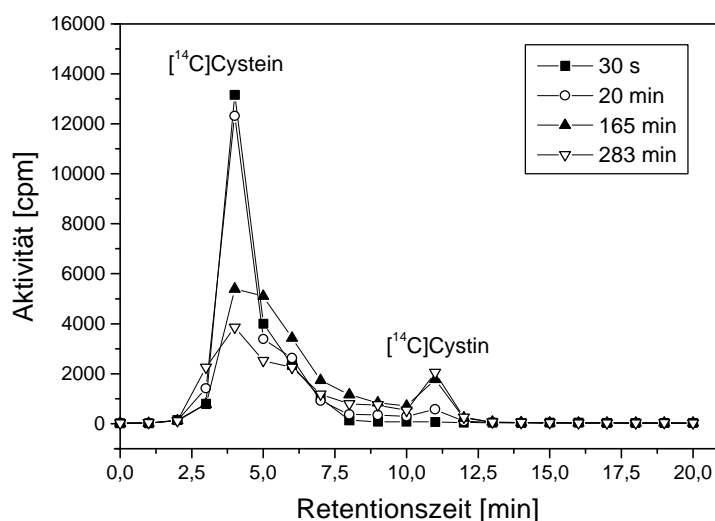


Abb. 33. Radiogramm aus der HPLC-Analyse eines Gemisches aus Cystein (10 mM), $[^{14}\text{C}]$ Cystein (138298 cpm), DTPA (700 μM) und SNP (5 mM) in Puffer A. Nach den im Label angegebenen Zeiten wurden 200 μl -Aliquots in die HPLC (System A, Eluent A) injiziert und 1 min-Fractionen gesammelt und die Radioaktivität gemessen.

5.2.7 Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen

Die Gleichgewichtskonstanten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten S-Transnitrosylierungs-Reaktionen sind mit zuvor in einer anderen Arbeit [48] ermittelten Gleichgewichtskonstanten anderer S-Transnitrosylierungs-Reaktionen der Vollständigkeit halber in Tab. 4 zusammenfassend dargestellt. Die höchsten K_{eq} -Werte wurden für Reaktion 5 ($\text{NAC} + \text{SNAP} \rightleftharpoons \text{SNAC} + \text{NAP}$; $K_{\text{eq}} = 7,7$) und Reaktion 3 ($\text{GSH} + \text{SNAP} \rightleftharpoons \text{GSNO} + \text{NAP}$; $K_{\text{eq}} = 6,7$) erhalten. In Ansätzen, die SNC, SNAP und ihre korrespondierenden Thiole enthielten, sowie in quartenären Gemischen, in denen SNC und SNAP vorhanden waren (s. 5.2.8), kam es zu einem schnellen Verschwinden von SNC und SNAP. So erhielt man für Reaktion 6 nach einer Minute ein Konzentrationsverhältnis von SNC zu SNAP von 2,9, nach 20 Minuten hingegen eines von 9,3. Zu diesen Zeitpunkten betrug die SNAP-Konzentration 29 bzw. 10 μM , die SNC-Konzentration 14 und 1,5 μM . Nach 40 min war weder SNAP noch SNC detektierbar. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß SNAP allein in Pufferlösungen mit physiologischem pH-Wert nur recht langsam zerfällt. Die Daten in Tab. 4 zeigen, daß in

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen von allen getesteten S-Nitroso-Substanzen SNhC und SNAC gegenüber GSNO, SNALB, SNAP und SNC bevorzugt sind.

Tab. 4. Gleichgewichtskonstanten für verschiedene Systeme von S-Nitroso-Substanzen und ihren korrespondierenden Thiolen.

Reaktion (A + B \rightleftharpoons C + D)	Gleichgewichtskonstante (K_{eq}) $K_{eq} = ([C] \cdot [D])/[A] \cdot [B]$
1. GSH + SNC \rightleftharpoons GSNO + Cys	1,98
2. GSH + SNAC \rightleftharpoons GSNO + NAC	0,35
3. GSH + SNAP \rightleftharpoons GSNO + NAP	6,67
4. Cys + SNAC \rightleftharpoons SNC + NAC	0,20
5. NAC + SNAP \rightleftharpoons SNAC + NAP	7,67
6. Cys + SNAP \rightleftharpoons SNC + NAP	2,89/9,34*
7. hCys + GSNO \rightleftharpoons SNhC + GSH	2,09
8. hCys + SNC \rightleftharpoons SNhC + Cys	5,01
9. hCys + SNC \rightleftharpoons SNhC + Cys	1,22
10. GSH + SNALB \rightleftharpoons GSNO + ALB	0,59
11. Cys + SNALB \rightleftharpoons SNC + ALB	0,75

Die Konzentration der S-Nitroso-Substanzen betrug je 20 μ M in allen Ansätzen. Die Thiol-Konzentrationen betrugen bei den Reaktionen 1-9 je 500 μ M, in den Reaktionen 10 und 11 je 250 μ M. Nur die Reaktionen 10 und 11 wurden in Gegenwart von 1 mM DTPA durchgeführt. Die Konzentrationen der niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen wurden nach 15 min Inkubation durch Injektion eines 200 μ l-Aliquots in die HPLC (System A, Eluent A, 333 nm) bestimmt. Die Konzentration von SNALB nach 15 min Inkubation wurde nach Extraktion der Plasma-Proteine mittels 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen mittels GC-MS bestimmt. Die fett gedruckten Reaktionen (6-11) wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Daten zu den Reaktionen 1-6 stammen aus [48].

* Instabiles Gleichgewicht

5.2.8 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in einem quartenären Gemisch aus GSNO, SNC, SNAC und SNAP und ihren Thiolen

Die Inkubation von GSNO, SNC, SNAC und SNAP mit ihren korrespondierenden Thiolen in Tris-Puffer führte zu einer schnellen Abnahme der SNC- und SNAP-Konzentration (Abb. 34). Gleichzeitig nahm die Konzentration von SNAC und GSNO zu. Nach einer Minute betrugen die Konzentrationen der S-Nitroso-Substanzen 50 μ M für SNAC, 25 μ M für GSNO, 2 μ M für SNC und 5 μ M für SNAP. Während nach 20 min die SNC- und SNAP-Konzentrationen nicht mehr bestimmbar waren, nahmen die SNAC- und GSNO-Konzentration innerhalb der folgen-

den 39 min lediglich um 8 μM (SNAC) bzw. 5 μM (GSNO) ab. Diese Ergebnisse zeigen einen fast quantitativen Transfer der NO-Gruppe von SNC und SNAP auf die SH-Gruppen von NAC und GSH, wobei mehr auf NAC als auf GSH übertragen wurde. Das Konzentrationsverhältnis von GSNO zu SNAC betrug 0,5, 0,52 und 0,48 nach 1, 20 und 40 min und ist in guter Übereinstimmung mit dem K_{eq} -Wert der Reaktion in Tab. 4, der in einer früheren Arbeit bestimmt wurde [48]. Das bedeutet, daß sich dieses quartenäre System im Gleichgewicht entsprechend dem binären System, bestehend aus GSNO, SNAC und den korrespondierenden Thiolen, verhält.

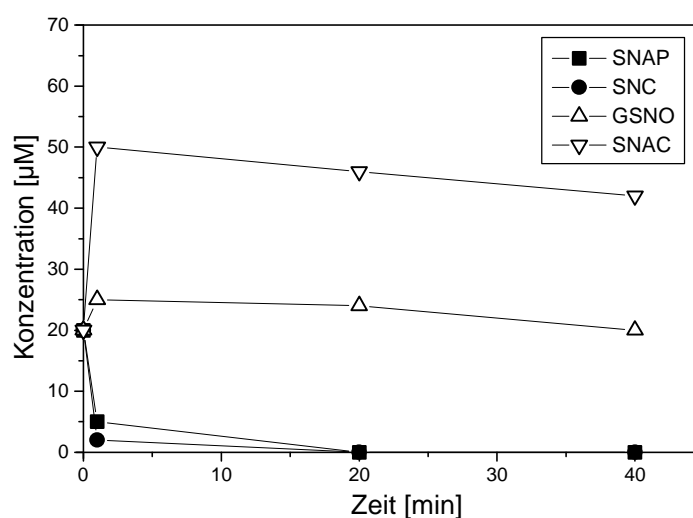


Abb. 34. Zeitliche Verläufe der SNAP-, SNC-, GSNO- und SNAC-Konzentration bei der Inkubation von je 20 μM dieser S-Nitroso-Substanzen in Gegenwart von je 500 μM der korrespondierenden Thiole NAP, Cys, GSH und NAC in Tris-Puffer (0,2 M, pH 7,4). Zu den angegebenen Zeiten wurden 200 μl -Aliquots des Ansatzes mittels HPLC (System A, Eluent A, 333 nm) analysiert.

5.3 (S-Trans)nitrosylierungs-Reaktionen in Plasma und Vollblut

Im vorangegangenen Kapitel wurden der Mechanismus und die Reaktionsprodukte von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen untersucht. Ferner wurden Gleichgewichtskonstanten von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in gepufferten wäßrigen Lösungen bestimmt. Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob und in welchem Maße diese Ergebnisse auf die wesentlich komplexeren Medien Plasma und Vollblut übertragbar sind. Vor allem ist von Interesse, welche Substanzen (authentisches NO, NO-Donoren wie GTN und SNP und verschiedene

S-Nitroso-Substanzen) in Plasma oder Vollblut zur Bildung von Plasma-SNALB führen können.

Etwa sechs Sekunden nach der SNC-Zugabe zu frisch gewonnenem Human-Plasma ohne bzw. mit DTPA (1 mM) wurden 24,2 bzw. 18,3 μM SNALB im Plasma gemessen (Abb. 35 A). Zu diesem Zeitpunkt betrug die SNC-Konzentration im Plasma 43,6 bzw. 57 μM . Danach stieg die SNALB-Konzentration deutlich langsamer an. Während der gesamten Inkubationszeit waren die SNALB-Konzentrationen in Abwesenheit von DTPA deutlich und konstant niedriger als in seiner Anwesenheit. Die SNC-Konzentration nahm während der Inkubationszeit konstant ab: Nach 60 min betrug die SNC-Konzentration 6 μM in Gegenwart von DTPA und 4 μM in seiner Abwesenheit. Abb. 35 B zeigt, daß in diesem Experiment die Gesamtheit der Plasma-Thiole unmittelbar nach der SNC-Zugabe leicht zunahm und im weiteren Zeitverlauf wieder abnahm, und zwar in Abwesenheit von DTPA deutlich stärker als in seiner Gegenwart. Am Ende des Experiments betrug die Nitrit-Konzentration im Plasma 12,9 bzw. 10,4 μM in Ab- bzw. Anwesenheit von DTPA.

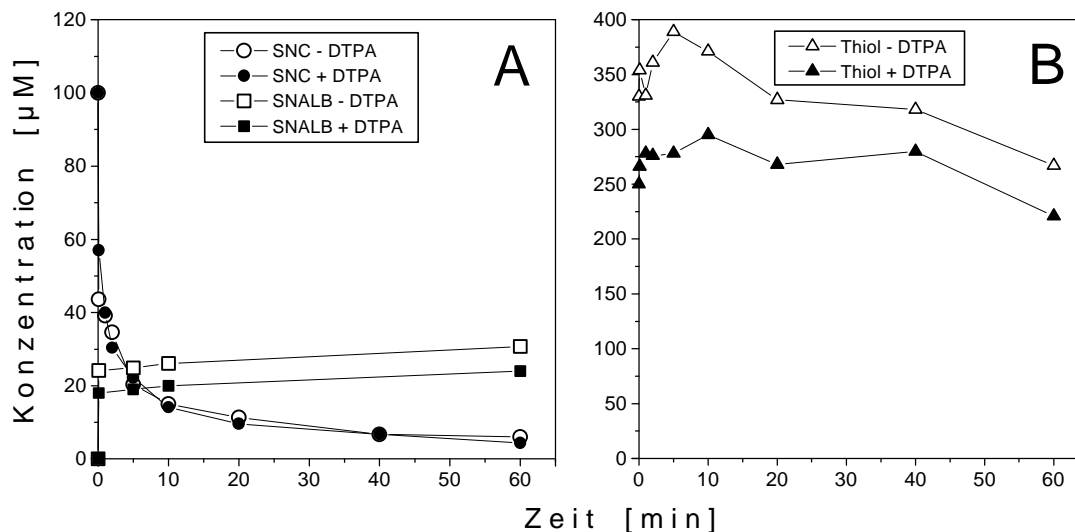


Abb. 35. Konzentrations-Zeit-Verläufe von Plasma-SNALB und -SNC (A) bzw. der gesamten Plasma-Thiole (B) nach Inkubation von 100 μM SNC in Human-Plasma (EDTA) in Gegenwart (1 mM) und Abwesenheit von DTPA.

Abb. 36 A zeigt, daß eine 10-minütige Inkubation von GSNO, SNC und SNhC in frischem Human-Plasma (EDTA) zu einer konzentrationsabhängigen SNALB-Bildung im getesteten Konzentrationsbereich (0-100 μM) führte. Von allen untersuchten S-Nitroso-Substanzen

fürte SNC in Abwesenheit von DTPA über den gesamten Konzentrationsbereich zu den höchsten Konzentrationen von SNALB. Abb. 36 B zeigt, daß in diesem Experiment die verbleibenden Konzentrationen der zugegebenen niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen ebenfalls abhängig von ihren zugegebenen Konzentrationen waren.

Die höchste verbleibende Konzentration wurde bei SNhC und GSNO beobachtet. Die Verwendung von DTPA im Plasma führte zu einer über die gesamte Inkubationszeit konstanten Verringerung der SNALB-Bildung und zu höheren verbleibenden SNC-Konzentrationen im Plasma.

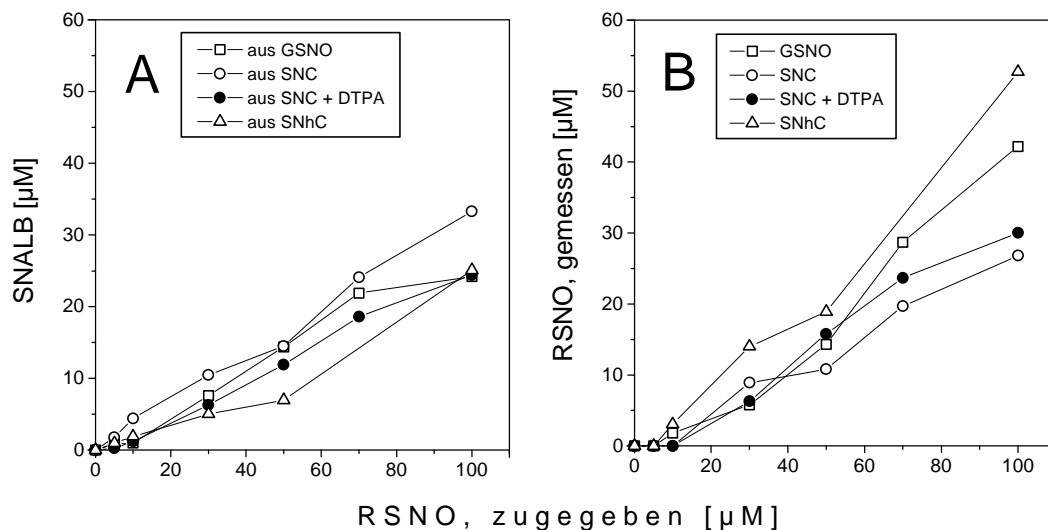


Abb. 36. Abhängigkeit der SNALB-Bildung (A) und der verbleibenden Konzentrationen der niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen (RSNO) im Plasma (B) von der RSNO-Konzentration, die dem Plasma zugegeben wurde. GSNO, SNC (in An- und Abwesenheit von 1 mM DTPA) und SNhC wurden für 10 min in Plasma (EDTA) separat inkubiert.

Der Effekt des verwendeten Anticoagulanz auf die Bildung von SNALB und die verbleibenden niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen im Plasma nach deren Inkubation in Vollblut ist in Abb. 37 zu sehen: Sowohl bei Verwendung von EDTA als auch von Citrat führte die Zugabe von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen zur konzentrationsabhängigen SNALB-Bildung im Plasma. Allerdings führte die Verwendung von EDTA gegenüber der Verwendung von Citrat zu höheren SNALB-Konzentrationen (Abb. 37 A).

Trotz der Verwendung von DTPA im Citrat-Blut konnte hier nach Zugabe von SNC zum Vollblut im Plasma kein verbleibendes SNC gemessen werden (Abb. 37 B). Im Gegensatz dazu konnte in EDTA-Blut sowohl in An- als auch in Abwesenheit von DTPA verbleibendes SNC im Plasma gemessen werden, sofern die zugesetzte SNC-Konzentration initial mehr als 30 μM betrug.

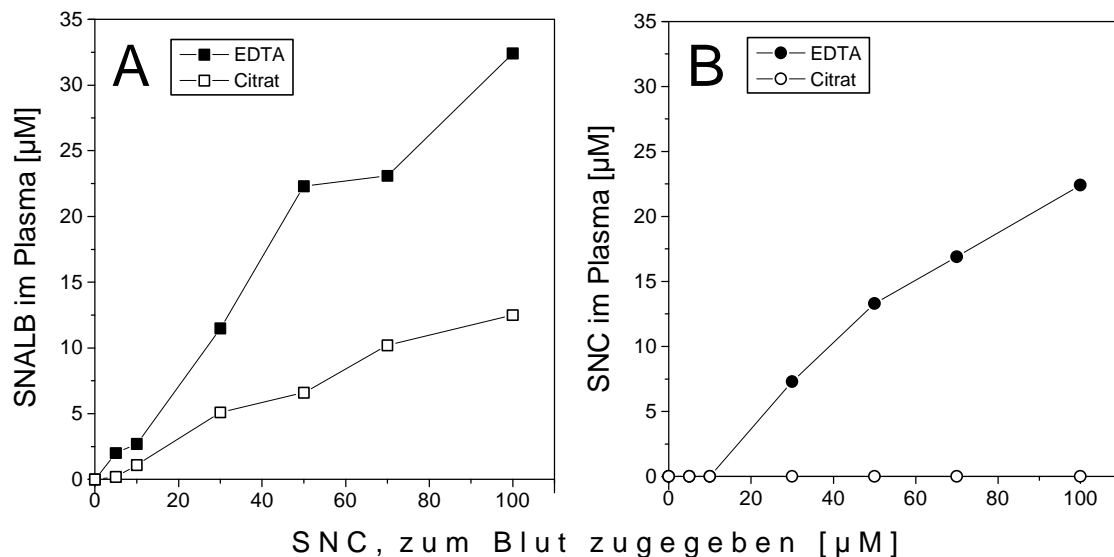


Abb. 37. Abhängigkeit der SNALB-Bildung (A) und der verbleibenden SNC-Konzentration in Plasma (B) von der SNC-Konzentration, die zum Blut (EDTA oder Citrat als Anticoagulant) zugegeben wurde. SNC wurde in Blut für 10 min inkubiert und das Blut anschließend zentrifugiert (5 min, 800 g, 4°C). Im Citrat-Blut war DTPA in einer Konzentration von 1 mM vorhanden. Im EDTA-Blut wurde kein DTPA verwendet.

In parallelen Experimenten mit Blut und Plasma wurde die Fähigkeit von NO, SNP und GTN zur S-Nitrosylierung von Albumin untersucht. Als Vergleich wurden SNC und GSNO verwendet. In Übereinstimmung mit vorherigen Versuchen (s. Abb. 35 - Abb. 37) zeigt Abb. 38, daß die Reaktion SNC und GSNO mit Albumin in einem vergleichbaren Ausmaß zur SNALB-Bildung führt.

NO, zugegeben in Form einer wäßrigen Lösung, reagierte ebenfalls mit der Thiolgruppe von Albumin, aber in einem deutlich geringeren Maße als SNC und GSNO. Im Gegensatz dazu führten SNP und GTN zu keiner meßbaren SNALB-Bildung, weder im Plasma noch im Vollblut.

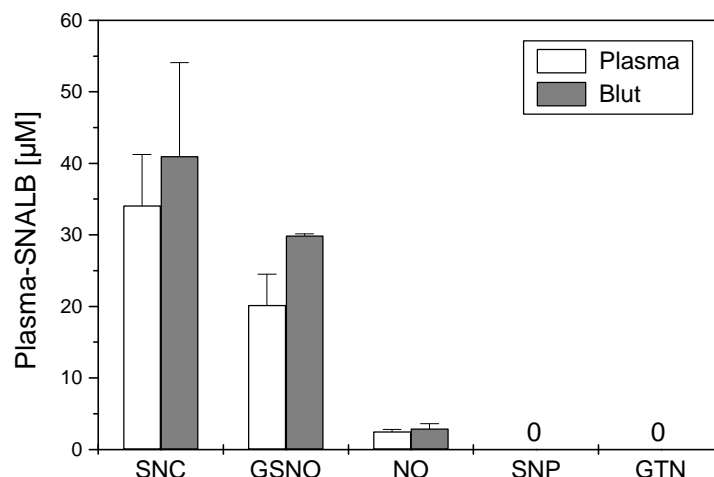


Abb. 38. Bildung von SNALB nach separater 10-minütiger Inkubation von SNC, GSNO, NO, SNP und GTN (je 100 μM) in Plasma bzw. Blut (EDTA). Die Konzentrationen sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Es wurde Blut von vier (SNC) bzw. zwei (GSNO, NO, SNP und GTN) gesunden Spendern unmittelbar nach dessen Gewinnung eingesetzt. In diesen Experimenten wurde kein DTPA verwendet. Bei den Experimenten mit NO diente eine gesättigte NO-Lösung (ca. 2 mM) in deoxygeniertem Puffer A als Stammlösung.

5.4 Transport und Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen in humanen Erythrozyten

Erythrozyten sind verantwortlich für die Inaktivierung von NO über seine Oxidation zu Nitrat [107]. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß SNC und GSNO in Plasma vorwiegend zu Nitrit, in vollem Blut hingegen zu Nitrat metabolisiert werden [48]. Daher stellte sich die Frage, ob Erythrozyten auch für die Inaktivierung von S-Nitroso-Substanzen zu Nitrat verantwortlich sind. Zunächst wurde untersucht, ob S-Nitroso-Substanzen in das Cytosol von Erythrozyten gelangen können. Für entsprechende *in vitro*-Experimente wurden vorwiegend gewaschene menschliche Erythrozyten verwendet.

5.4.1 Identifikation von intrazellulär gebildetem GS¹⁵NO in menschlichen Erythrozyten

Abb. 39 B zeigt, daß die Inkubation von S[¹⁵N]C mit menschlichen Erythrozyten zur Bildung einer Verbindung führte, die bei der für S-Nitroso-Substanzen charakteristischen Wellenlänge von 333 nm absorbiert und die gleiche HPLC-Retentionszeit wie synthetisches GSNO (Probe A, Abb. 39 A, Retentionszeit 15 min) hat. Die GC-MS-Analyse von 1 min-Fractionen des Effluenten der Probe B zeigte im Peakflächenverhältnis m/z 47 zu m/z 46 einen starken Anstieg bei der Retentionszeit von synthetischem GSNO (Abb. 39 C). Dies ist ein deutlicher

Hinweis auf die Bildung von intrazellulärem GS¹⁵NO in den mit S¹⁵NC inkubierten Erythrozyten. Die Anstiege des Peakflächenverhältnisses m/z 47 zu m/z 46 bei 2 und 7 min weisen auf intrazelluläres [¹⁵N]Nitrit und S¹⁵NC hin.

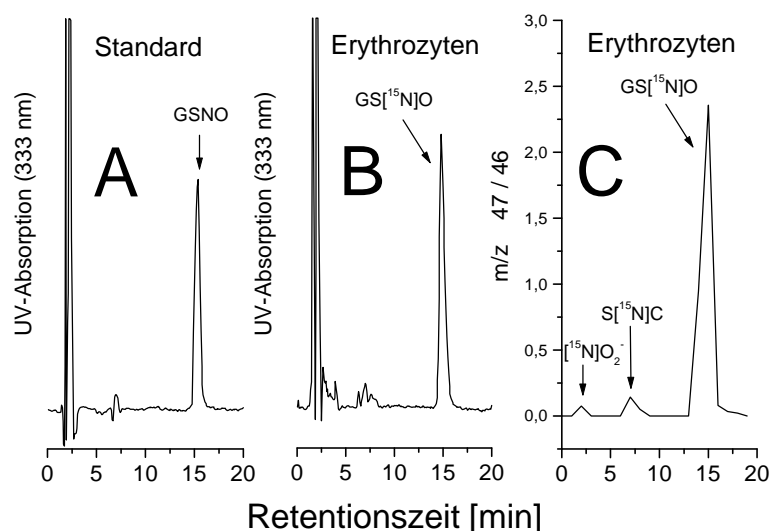


Abb. 39. Gewaschene Erythrozyten, gewonnen aus 3 ml humanem venösem Blut (EDTA), wurden in physiologischer NaCl resuspendiert und mit S¹⁵NC (400 µM) versetzt. Das Volumen des Inkubations-Ansatzes betrug 3 ml. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Ein 200 µl-Aliquot des Cytosols aus den erneut gewaschenen und lysierten Erythrozyten wurde nach Ultrafiltration in die HPLC (System A, Eluent A, Flußrate 1 ml/min, UV-Detektion bei 333 nm) injiziert. **(A)** UV-Profil eines synthetischen GSNO-Standards (12,5 µM, Probe A); **(B)** UV-Profil der HPLC-Analyse des Erythrozyten-Cytosols nach Inkubation mit S¹⁵NC (Probe B); **(C)** GC-MS-Profil von Probe B: 1 min-Fractionen wurden gesammelt, mit 1 mM HgCl₂ behandelt, derivatisiert und auf Nitrit mittels GC-MS analysiert. Die Peakflächenverhältnisse von m/z 47 ([¹⁵N]Nitrit) und m/z 46 ([¹⁴N]Nitrit) wurden gegen die Retentionszeit aufgetragen.

Zur Struktur-Aufklärung wurden die HPLC-Fractionen (13-16 min) der Probe A (synthetisches GSNO) und der Probe B (intrazelluläres GS¹⁵NO) mittels Festphasen-Extraktion über microcon SCX-Kartuschen extrahiert. Die Rechromatographie von 20 µl-Aliquots der Eluate führte jeweils nur zu einem einzigen Peak mit der Retentionszeit von GSNO. Eine ESI-MS-Analyse der Eluate wurde durchgeführt, indem die Mutter-Ionen [M+H]⁺ mit m/z 337,5 für GSNO und m/z 338,5 für GS¹⁵NO einer Kollisions-aktivierten Dissoziation unterzogen wurden. Die erhaltenen Tochter-Ionen-Massenspektren sind in Abb. 40 dargestellt. Mit Ausnahme der Mutter- und der Tochter-Ionen, die noch die [¹⁵N]Nitroso-Gruppe enthalten, sind die Massenspektren von synthetischem GSNO und dem intrazellulären GS¹⁵NO sehr ähnlich.

Die Bildung des Tochterions mit m/z 307,5 aus m/z 338,5 entsteht durch den neutralen Verlust von 31, höchst wahrscheinlich von ^{15}NO . Das ist ein eindeutiger Beweis für die intrazelluläre Bildung von GS^{15}NO in Erythrozyten, die mit S^{15}NC inkubiert wurden.

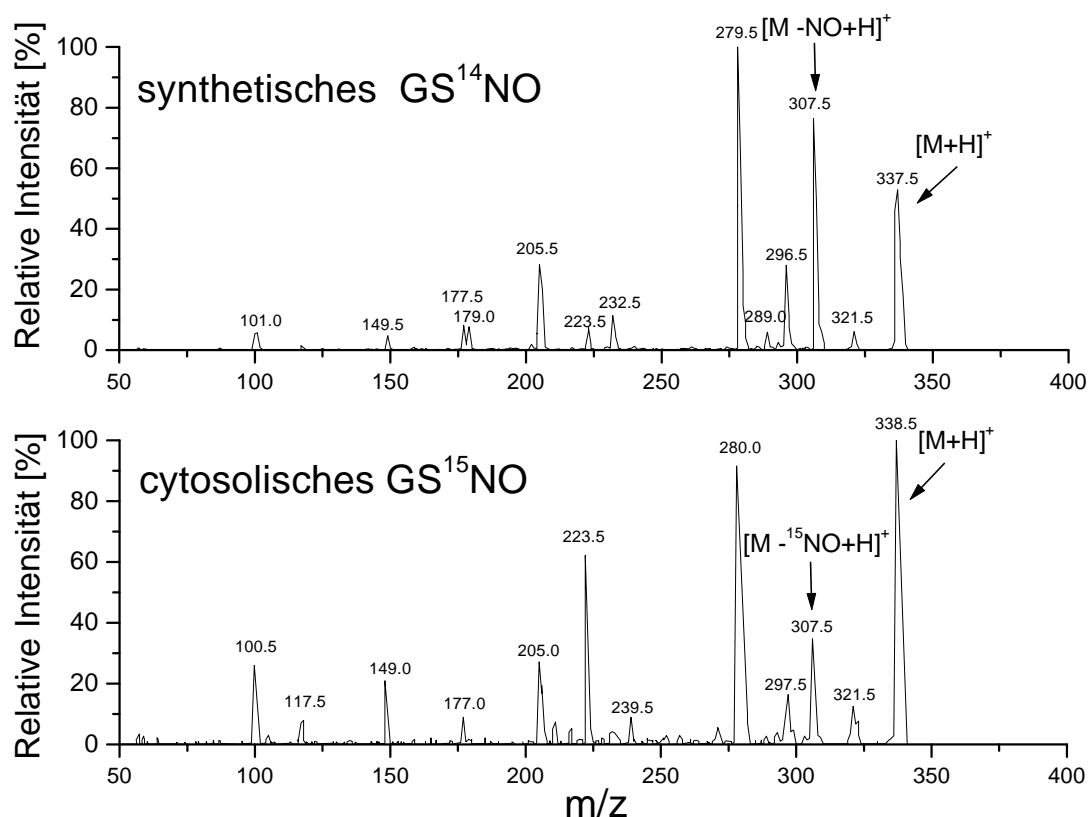


Abb. 40. ESI-MS-Tochter-Spektren von HPLC-Fractionen (System A, Eluent A) mit der Retentionszeit von synthetischem GSNO. Oben: Synthetisches GSNO, unten: Cytosol-Ultrafiltrat aus lysierten menschlichen Erythrozyten, die mit S^{15}NC inkubiert wurden.

5.4.2 Abhängigkeit der GSNO-Bildung in Erythrozyten von der Inkubationszeit und der SNC-Konzentration

Abb. 41 zeigt, daß die Inkubation von Erythrozyten mit S^{15}NC nicht nur zur Bildung von GS^{15}NO , sondern auch zur Bildung von Cystein, ^{15}N -Nitrat und ^{15}N -Nitrit führt. Die intrazelluläre Bildung von GS^{15}NO , Cystein und ^{15}N -Nitrat in menschlichen Erythrozyten ist abhängig von der Inkubationszeit bei einer konstanten Konzentration von S^{15}NC (Abb. 41 A) und von der S^{15}NC -Konzentration bei einer konstanten Inkubationszeit (Abb. 41 B). In beiden Fällen folgte die intrazelluläre GS^{15}NO -Bildung einem sigmoiden Verlauf. Bei niedrigen extrazellulären S^{15}NC -Konzentrationen bzw. kurzen Inkubationszeiten ist in menschlichen

Erythrozyten offenbar die Oxidation von SNC zu Nitrat durch Oxyhämoglobin gegenüber der S-Transnitrosylierung von GSH bevorzugt. Bei höheren SNC-Konzentrationen bzw. längeren Inkubationszeiten nimmt dagegen der Anteil der S-Transnitrosylierung zu. Auch [^{15}N]Nitrit wurde im Cytosol gebildet, das Hauptprodukt von GS^{15}NO ist jedoch [^{15}N]Nitrat: nach 20 min Inkubation mit $600\ \mu\text{M S}^{15}\text{NC}$: $10\ \mu\text{M}$ [^{15}N]Nitrit und $190\ \mu\text{M}$ [^{15}N]Nitrat.

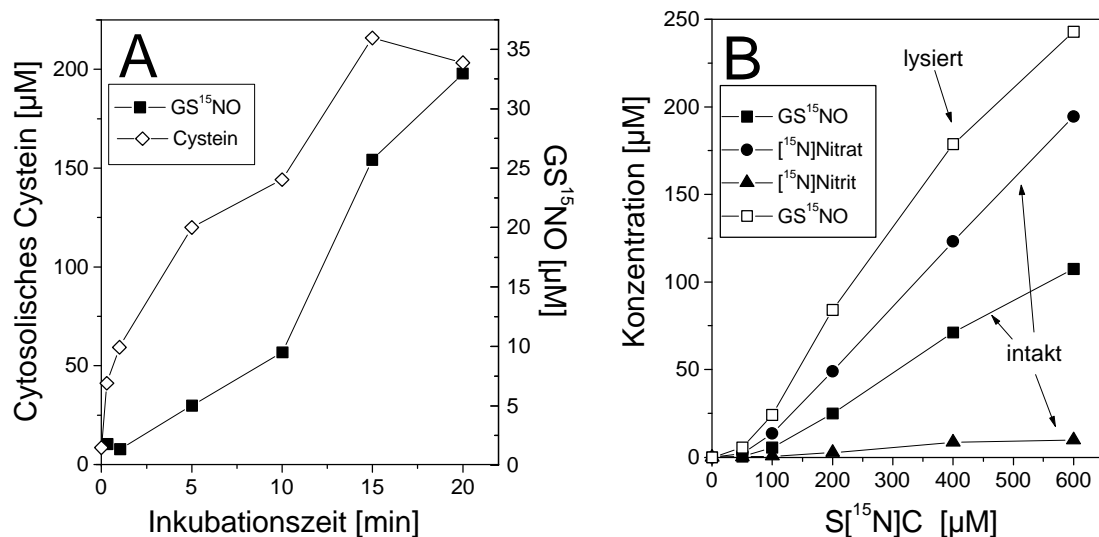


Abb. 41. (A): Abhängigkeit der intrazellulären Bildung von GS^{15}NO und Cystein in menschlichen gewaschenen Erythrozyten von der Inkubationszeit. Die S ^{15}NC -Konzentration betrug $400\ \mu\text{M}$. (B): Abhängigkeit der intrazellulären Bildung von GS^{15}NO , [^{15}N]Nitrat und [^{15}N]Nitrit in intakten (geschlossene Symbole) und GS^{15}NO in lysierten (offene Symbole) gewaschenen menschlichen Erythrozyten von der S ^{15}NC -Konzentration. Die Inkubationszeit betrug 20 min.

Die Zugabe von S ^{15}NC zu lysierten, gewaschenen Erythrozyten führte ebenfalls zur konzentrationsabhängigen Bildung von GS^{15}NO . Verglichen mit intakten Erythrozyten waren die gebildeten GS^{15}NO -Konzentrationen in lysierten Erythrozyten erheblich höher (Abb. 41 B). Die intrazelluläre GSNO-Konzentration erreichte bei dem Experiment mit lysierten Erythrozyten auch bei einer S ^{15}NC -Konzentration von $600\ \mu\text{M}$ noch kein Plateau. Dies weist auf eine hohe Kapazität intakter Erythrozyten für S-Transnitrosylierungen hin. Da diese sehr wahrscheinlich von der hohen cytosolischen GSH-Konzentration ($2,6\ \text{mM}$ bei diesem Spender) in Erythrozyten herrührt, ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß die GSH-Konzentration beim Versuch mit den lysierten Erythrozyten nur halb so groß war wie beim Versuch mit intakten. Die extrazellulären S ^{15}NC -Konzentrationen waren hingegen im Versuch mit intakten Erythrozyten größer als angegeben, da sich die Konzentrationsangaben auf das gesamte Volumen (des

Blutes und der lysierten Erythrozyten) beziehen. Die zeitabhängige Zunahme von Cystein im Cytosol gewaschener Erythrozyten (Abb. 41 A) folgt dem Verlauf einer Sättigungs-Kurve, und die intrazellulären Cystein-Konzentrationen sind nach gleichen Inkubationszeiten erheblich höher als die entsprechende intrazelluläre GS¹⁵NO-Konzentration. Dies stimmt mit der in Abb. 41 B gezeigten bevorzugten intrazellulären Nitrat-Bildung gut überein.

Die basalen Konzentrationen von Cystein und GSH in gewaschenen Erythrozyten von drei gesunden Spendern betrugen (als Mittelwert \pm SD) $9 \pm 3 \mu\text{M}$ für Cystein und $2330 \pm 302 \mu\text{M}$ für GSNO. Eine Bildung von intrazellulärem S¹⁵NC konnte lediglich bei der höchsten Konzentration von extrazellulär zugegebenem S¹⁵NC ($600 \mu\text{M}$) mittels HPLC in einer Konzentration von ca. $4 \mu\text{M}$ detektiert werden. Die Konzentrationen von cytosolischem Cystein und GSNO betrugen in dieser Probe 195 bzw. $108 \mu\text{M}$. Die gemessene intrazelluläre SNC-Konzentration entspricht ungefähr dem Wert, der sich aus der gemessenen cytosolischen Cystein-GSH- und GSNO-Konzentration und dem K_{eq} -Wert der Reaktion $\text{GSNO} + \text{Cys} \rightleftharpoons \text{GSH} + \text{SNC}$ von 1,98 (Tab. 4) für die intrazelluläre SNC-Konzentration berechnen läßt. Es gilt:

$$[\text{SNC}] = \frac{[\text{GSNO}] \cdot [\text{Cys}]}{[\text{GSH}] \cdot K_{\text{eq}}} = \frac{108 \text{ mM} \cdot 195 \text{ mM}}{2330 \text{ mM} \cdot 1,98} = 4,56 \text{ mM} \quad (9)$$

[SNC], [GSNO], [Cys] und [GSH] sind die Konzentrationen der S-Nitroso-Substanzen bzw. Thiole im Cytosol der Erythrozyten.

5.4.3 Abhängigkeit der GSNO-Bildung in menschlichen Erythrozyten von verschiedenen S-Nitroso-Substanzen, authentischem NO, NONOat und Angeli's Salz

Es wurde die GSNO-Bildung nach separater Inkubation von L-SNC, D-SNC, S¹⁵NhC, SNAC, GSNO, SNAP, NO (als Gas), DETA NONOat und Angeli's Salz in gewaschenen Erythrozyten untersucht. Wie Abb. 42 zeigt, führten nur L-SNC, D-SNC und S-Nitroso-D,L-homocystein zur Bildung nennenswerter Konzentrationen von GSNO im Erythrozyten-Cytosol. L-SNC führte dabei zu signifikant höheren intrazellulären GSNO-Konzentrationen als D-SNC. Während SNAC und SNAP noch in geringem Maße zur cytosolischen GSNO-Bildung führten, war dies für GSNO selbst nicht der Fall. NO führte zu keiner meßbaren GSNO-Bildung in gewaschenen Erythrozyten, ebensowenig DETA NONOat und Angeli's Salz.

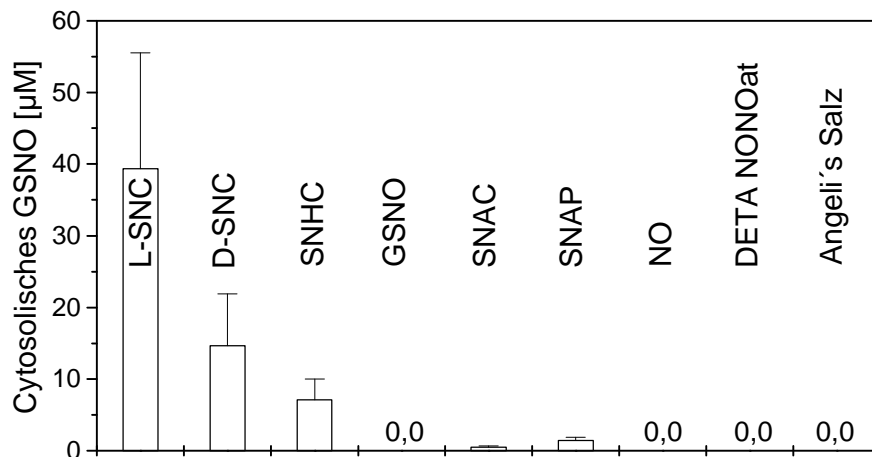


Abb. 42. Abhängigkeit der intrazellulären GSNO-Bildung in menschlichen gewaschenen Erythrozyten von verschiedenen S-Nitroso-Substanzen, authentischem NO (d. h. als Gas), NO- und NO⁻-Donatoren. Die Inkubationszeit betrug jeweils 10 min. Alle Substanzen wurden in Konzentrationen von 400 µM eingesetzt. Die GSNO-Konzentrationen sind als Mittelwerte \pm SD (Blut von einem Probanden, 2-5 Inkubationen) angegeben.

5.4.4 Inhibition der SNC-abhängigen GSNO-Bildung in gewaschenen Erythrozyten durch Aminosäuren

Cystein und Serin inhibierten die intrazelluläre GSNO-Bildung durch SNC in gewaschenen Erythrozyten um 80 ± 15 % bzw. 98 ± 5 %, Lysin inhibierte hingegen um 65 ± 10 % (Abb. 43).

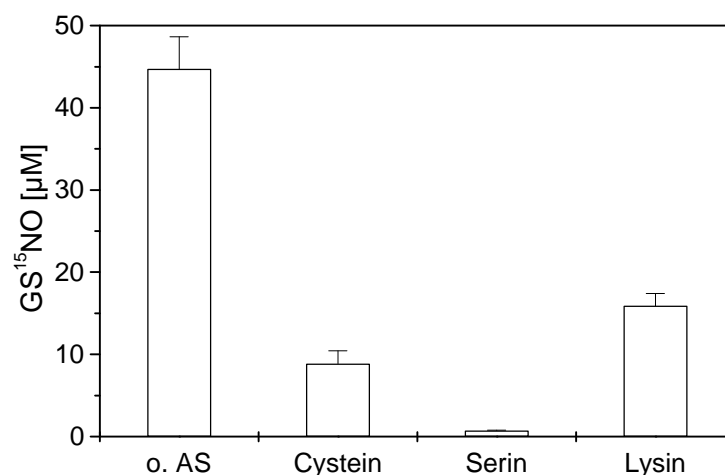


Abb. 43. Hemmung der Bildung von GS¹⁵NO im Cytosol von gewaschenen Erythrozyten nach fünfminütiger Kokubation von S¹⁵NC (600 µM) und den angegebenen Aminosäuren (10 mM). o. AS: ohne Aminosäure.

Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der GSNO-Bildung in Erythrozyten von der Serin-Konzentration zeigte eine exponentielle Abhängigkeit der intrazellulären GSNO-Konzentration von der zugegebenen Serin-Konzentration, während die intrazelluläre Cystein-Konzentration eher linear von der Serin-Konzentration abhängig war (Abb. 44).

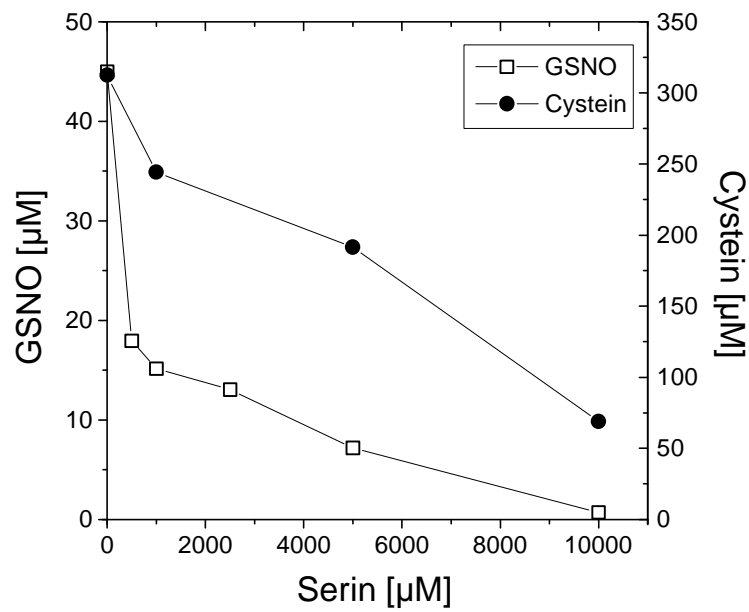


Abb. 44. Abhängigkeit der intrazellulären GSNO- und Cystein-Bildung in menschlichen gewaschenen Erythrozyten nach fünfminütiger Inkubation mit SNC (600 μM) von der Serin-Konzentration.

Die Inkubation von gewaschenen Erythrozyten mit SNC in An- und Abwesenheit von Serin führte im ganzen Konzentrationsbereich zu einer Verminderung der intrazellulären GSNO- und Cystein-Konzentration (Abb. 45).

Während die absoluten Konzentrations-Differenzen zwischen der intrazellulären GSNO-Konzentration in An- und Abwesenheit von Serin mit steigender SNC-Konzentration wachsen, ist der Unterschied der Differenz der Cystein-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Serin über den gesamten Konzentrationsbereich annähernd gleich.

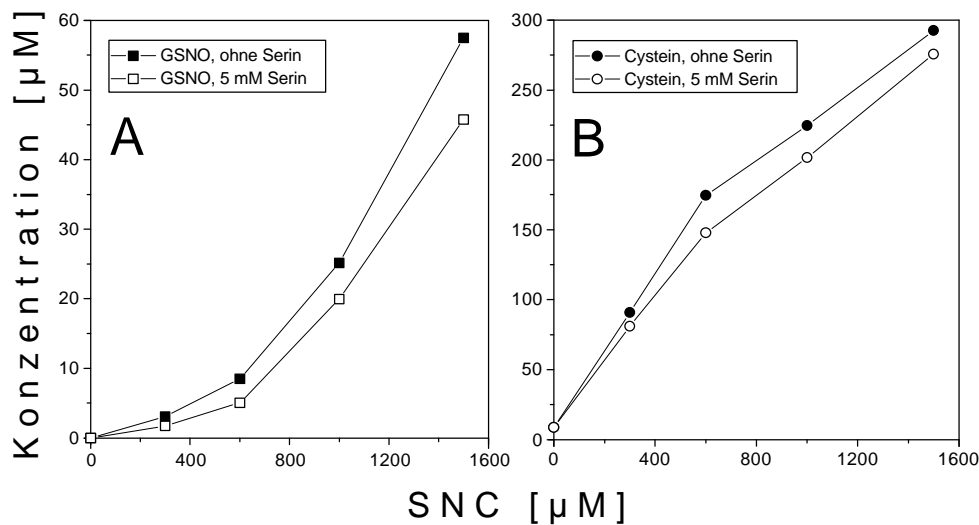


Abb. 45. Intrazelluläre GSNO- (A) und Cystein-Konzentration (B) nach dreiminütiger Inkubation von gewaschenen menschlichen Erythrozyten mit verschiedenen SNC-Konzentrationen in Anwesenheit (5 mM, offene Symbole) und Abwesenheit (geschlossene Symbole) von Serin.

5.4.5 Vergleich des Transportes von Cystein und SNC in das Erythrozyten-Cytosol

Gewaschene Erythrozyten, suspendiert in physiologischer NaCl, wurden mit SNC bzw. Cystein inkubiert und die Cystein-Konzentrationen im Erythrozyten-Cytosol bestimmt. Diese waren im gesamten Konzentrationsbereich nach Inkubation mit SNC deutlich höher als nach Inkubation mit Cystein (Abb. 46). Die Verläufe der intrazellulären Cystein-Konzentrationen ähneln dem Verlauf einer Sättigungs-Kurve.

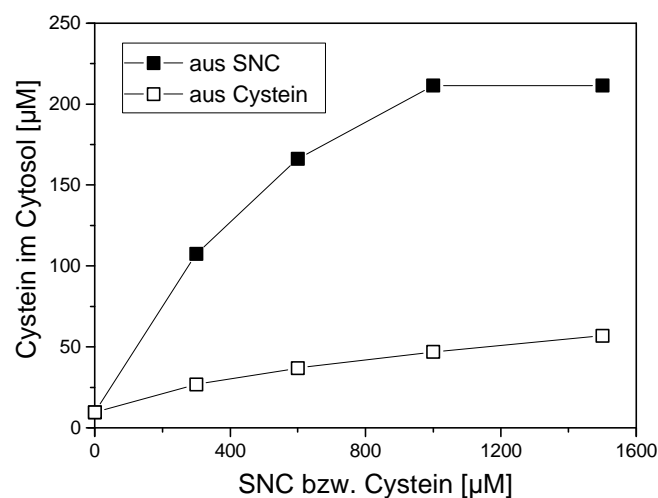


Abb. 46. Bildung von Cystein im Cytosol von menschlichen gewaschenen Erythrozyten nach dreiminütiger Inkubation mit SNC bzw. Cystein (jeweils 0-1500 μM).

5.4.6 Kinetische Untersuchungen zum Transport von SNC in Erythrozyten

Gewaschene Erythrozyten wurden mit SNC inkubiert. Sämtliche Inkubations-Ansätze hatten nach SNC-Zugabe einen neutralen pH-Wert. Als Maß für den Transport von SNC in die Erythrozyten wurde intrazelluläres Cystein gewählt.

Die intrazellulären Cystein-Konzentrationen folgten dem Verlauf einer Sättigungskurve mit einem annähernd linearen Bereich bis zu einer Konzentration von 1 mM SNC. Die GSNO-Konzentrationen im Erythrozyten-Cytosol folgten hingegen in Abhängigkeit von der eingesetzten SNC-Konzentration einem sigmoiden Verlauf. In Abb. 47 sind die Bildungsgeschwindigkeiten von GSNO und Cystein im Erythrozyten-Cytosol in Abhängigkeit von der eingesetzten SNC-Konzentration zu sehen. Aus Abb. 47 lassen sich anhand der Cystein-Bildungsgeschwindigkeiten die K_M - und V_{\max} -Werte des Transportes von SNC in den Erythrozyten und die maximale Bildungsgeschwindigkeit von GSNO im Erythrozyten-Cytosol abschätzen. K_M und V_{\max} betragen demnach 470 μM SNC und 95 μM Cystein/min. Die maximale Bildungsgeschwindigkeit von intrazellulärem GSNO ist kleiner und beträgt 15 μM GSNO/min.

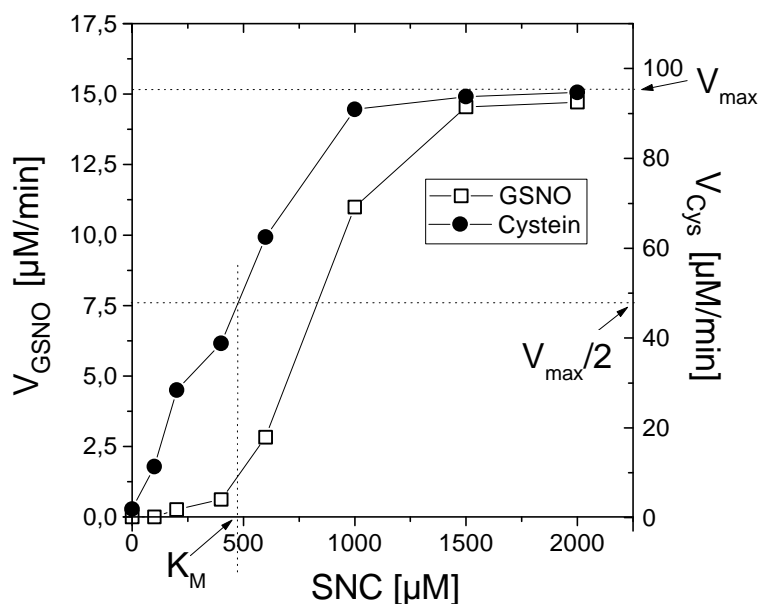


Abb. 47. Anfangs-Bildungsgeschwindigkeiten von GSNO und Cystein im Cytosol von gewaschenen menschlichen Erythrozyten nach Inkubation (3 min) mit verschiedenen SNC-Konzentrationen (0-2 mM) und daraus erhaltene Werte für K_M und V_{\max} (in Bezug auf die cytosolische Cystein-Konzentration). GSNO und Cystein wurden mittels HPLC-System A (Eluent A) bestimmt.

5.4.7 Bilanzierung des Transportes von SNC in gewaschenen Erythrozyten

Gewaschene Erythrozyten, suspendiert in physiologischer NaCl, wurden für 3 min mit SNC (1500 μM , bezogen auf das ganze Volumen) inkubiert. Anschließend erfolgte Zentrifugation (4°C, 800 g, 1 min). Im Überstand und im Erythrozyten-Cytosol wurden die Konzentrationen von Cystein, SNC und GSNO bestimmt.

Die Konzentration von SNC betrug im Überstand 1790 μM , während seine Konzentration im Cytosol 4 μM betrug. Die Cystein-Konzentration lag extrazellulär bei 60 μM , während sie intrazellulär 356 μM betrug. Extrazellulär konnte kein GSNO gemessen werden, während intrazellulär 75 μM GSNO vorlagen. Diese Daten zeigen, daß die SNC-Konzentration extrazellulär um 40 % abgenommen hat, während 30 % dieser SNC-Menge als Cystein im Cytosol wiedergefunden werden konnte. Es wurde nicht untersucht, wo und in welcher Form die restlichen 70 % von SNC verblieben sind. Eine Wiederholung dieses Versuchs, allerdings mit einer Inkubationszeit von 10 min, bestätigte diese Ergebnisse (nicht gezeigt).

5.4.8 Bestimmung von GSNO im Erythrozyten-Cytosol nach Inkubation von S^{15}NC in Vollblut

3 ml-Aliquots von Blut wurden mit S^{15}NC inkubiert, anschließend zentrifugiert (4°C, 800 g, 10 min) und in 400 μl -Aliquots der Plasma-Proben die SNALB-Konzentration mittels GC-MS bestimmt. Die Aufarbeitung der Erythrozyten-Fractionen und die Analyse von intrazellulärem GS^{15}NO , GSH und Cystein erfolgte analog zu den Versuchen mit gewaschenen Erythrozyten.

Die intrazellulären GSNO-Konzentrationen waren im Vergleich zu Versuchen mit gewaschenen Erythrozyten erheblich niedriger (Abb. 48). Der exponentielle Anstieg der GSNO-Konzentration im Erythrozyten-Cytosol mit steigender S^{15}NC -Konzentration ähnelt dem der cytosolischen GS^{15}NO -Konzentration nach Inkubation von S^{15}NC -Konzentration in gewaschenen Erythrozyten. Allerdings wurde im Versuch in Vollblut auch bei der höchsten S^{15}NC -Konzentration noch keine Sättigung erreicht (Abb. 48 B).

Erheblich höher als die hier gemessenen intrazellulären GS^{15}NO -Konzentrationen sind die S^{15}NALB -Konzentrationen in den Plasma-Fractionen. Sie steigen über den gesamten Konzentrationsbereich mit der zugesetzten S^{15}NC -Konzentration an (Abb. 48 A). Dies gilt auch

für das intrazelluläre Cystein, dessen Konzentrationen die gleiche Größenordnung haben wie bei Versuchen mit gewaschenen Erythrozyten.

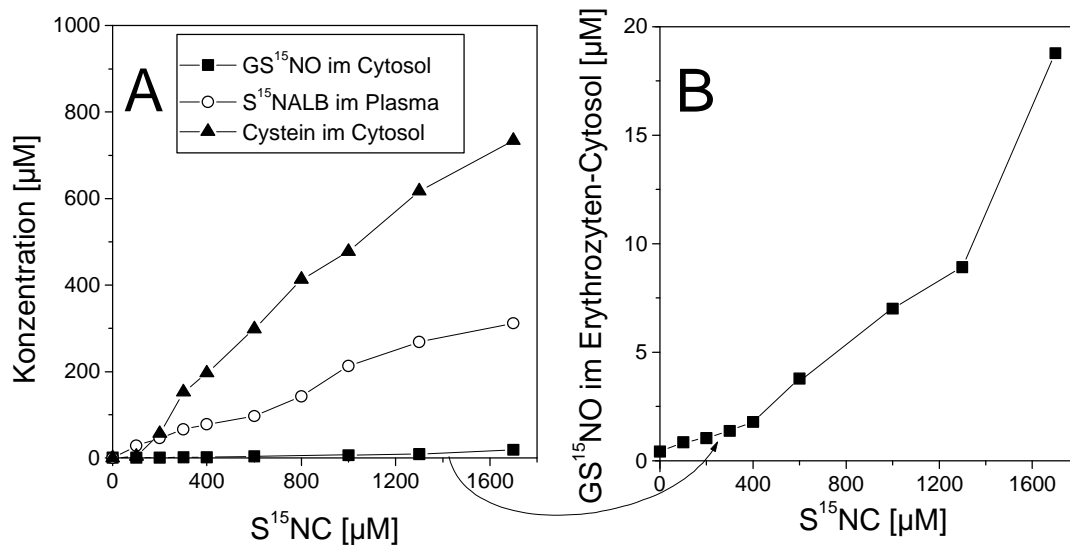


Abb. 48. Konzentration von $S^{15}NALB$ im Plasma und cytosolische $GS^{15}NO$ - und Cystein-Konzentrationen nach 20-minütiger Inkubation von $S^{15}NC$ (0-1700 μM , bezogen auf das gesamte Blutvolumen) in Vollblut (EDTA). (A) Direkter Vergleich der Konzentrationen. (B) Darstellung der intrazellulären $GS^{15}NO$ -Konzentration aus (A) mit einer um Faktor 50 höheren Auflösung der $GS^{15}NO$ -Konzentration. GSNO wurde mittels HPLC (System A, Eluent A) analysiert. Die Analyse von $S^{15}NALB$ erfolgte nach Extraktion der Plasma-Proteine mit 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen mittels GC-MS. Als interner Standard wurde den Plasma-Proben vor der Extraktion $S^{14}NALB$ (16,8 μM) zugesetzt.

5.4.9 $S^{15}NALB$ -Bildung in Plasma nach Inkubation mit $S^{15}NC$ vorinkubierten gewaschenen Erythrozyten

Re-Inkubation von mit $S^{15}NC$ behandelten und wiederholt gewaschenen Erythrozyten mit unbehandeltem Plasma führte zur $S^{15}NALB$ -Bildung in diesem Plasma (Abb. 49). Es bestand eine sigmoide Abhängigkeit der $S^{15}NALB$ -Konzentration im Plasma von der $S^{15}NC$ -Konzentration, mit denen die Erythrozyten zuvor inkubiert worden waren. Es ist interessant, daß die in diesem Versuch gemessenen Plasma-Konzentrationen von $S^{15}NALB$ (Abb. 49) von der gleichen Größenordnung wie die von $GS^{15}NO$ sind, die durch Inkubation von $S^{15}NC$ mit Vollblut entstanden sind (Abb. 48 B).

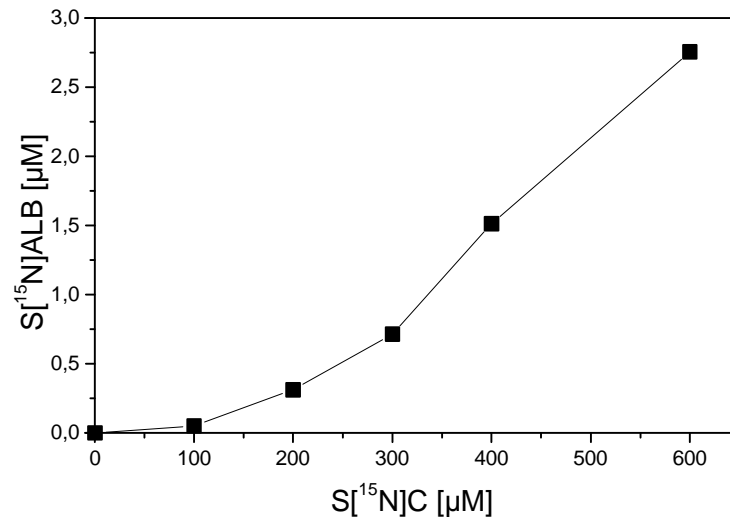


Abb. 49. Abhängigkeit der $S^{15}NALB$ -Bildung in Human-Plasma von der $S^{15}NC$ -Konzentration. Menschliche gewaschene Erythrozyten wurden mit den angegebenen $S^{15}NC$ -Konzentrationen für 10 min inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der $S^{15}NC$ -behandelten Erythrozyten wurden sie mit dem nicht behandelten Original-Plasma für 10 min reinkubiert. $S^{15}NALB$ wurde mittels HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen aus dem Plasma extrahiert und mittels GC-MS analysiert.

5.4.10 Inhibition der ADP-induzierten Plättchenaggregation in plättchenreichem Plasma durch mit $S^{15}NC$ vorinkubierte und gewaschene Erythrozyten

Humane Erythrozyten von zwei Spendern, die mindestens 10 Tage vorher kein Aspirin oder andere antiaggregatorisch wirkende Medikamente genommen hatten, wurden mit $S^{15}NC$ inkubiert. Diese Erythrozyten wurden erneut fünfmal gewaschen und mit dem ursprünglichen, unbehandelten PRP für 15 min in Ab- und Anwesenheit von extern zugegebenem Cystein ($10 \mu M$ im PRP) reinkubiert. Das PRP, das durch Zentrifugation dieses „Blutes“ erhalten wurde, wurde für Plättchenaggregations-Versuche verwendet. Als Kontroll-Probe diente PRP, das auf gleiche Weise gewonnen wurde, mit der Ausnahme, daß das zuerst gewonnene PRP mit unbehandelten gewaschenen Erythrozyten inkubiert wurde. Die maximale Inhibition der ADP-induzierten Plättchenaggregation wurde mit $10 \mu M$ SNC bestimmt. Abb. 50 zeigt, daß in Gegenwart von Cystein mit $S^{15}NC$ vorinkubierte Erythrozyten zu einer deutlichen Hemmung der Plättchenaggregation führen. In Abwesenheit von Cystein wurde keine Hemmung gemessen. Offenbar ist die Entwicklung der antiaggregatorischen Wirkung von mit SNC vorinkubierten Erythrozyten abhängig von zum PRP gegebenem Cystein. Dieser Versuch zeigt, daß mit SNC vorbehandelte Erythrozyten eine biologische Aktivität *in vivo* besitzen könnten.

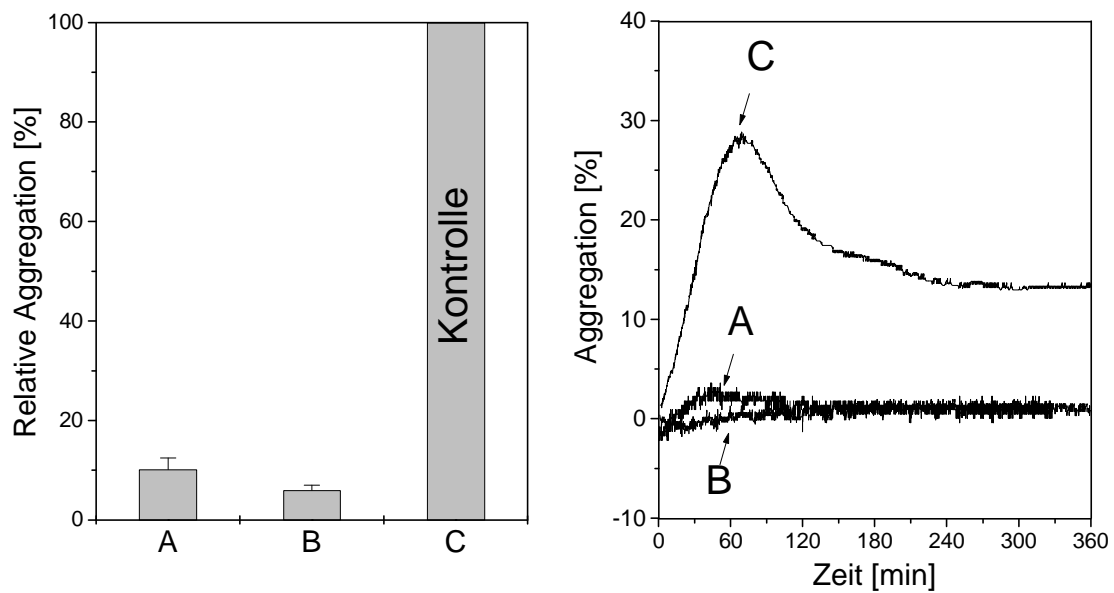


Abb. 50. Inhibition der Plättchenaggregation in PRP nach seiner Inkubation (15 min) mit gewaschenen menschlichen Erythrozyten, die zuvor für 20 min mit $S^{15}NC$ (400 μM) inkubiert worden waren. Dem PRP wurde vor der Aggregationsmessung Cystein (10 μM) zugesetzt. Die Plättchenaggregation wurde mit 1 μM ADP induziert. **Linke Seite:** (A) Relative Aggregation in PRP, das mit $S^{15}NC$ -behandelten Erythrozyten inkubiert wurde. (B) Relative Aggregation von PRP, das mit SNC (10 μM) inkubiert wurde. (C) Relative Aggregation von PRP, das mit gewaschenen Erythrozyten, die zuvor in SNC-freier physiologischer NaCl behandelt wurden, inkubiert wurde (Kontrolle). Die hier gemessenen maximalen Aggregationen wurden zu 100 % gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD aus zwei Experimenten mit je einem gesunden männlichen und einem weiblichen Spender angegeben. **Rechte Seite:** Plättchenaggregations-Kurven, die für die unter A, B und C beschriebenen Fälle für den weiblichen Spender erhalten wurden.

5.4.11 Speicherung von GSNO in Erythrozyten, resuspendiert in Plasma und physiologischer NaCl-Lösung

Frisch gewonnenes Blut (EDTA als Anticoagulant) wurde zentrifugiert, das Plasma abgetrennt und auf Eis aufbewahrt. Die Erythrozyten wurden dreimal gewaschen, auf das ursprüngliche Volumen mit physiologischer NaCl aufgefüllt, mit $L-S^{14}NC$ für 20 min inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Der Ansatz wurde in 3 ml-Aliquots unterteilt, diese zentrifugiert, die Überstände abgenommen und zwei Erythrozyten-Fractionen wurden mit dem ursprünglichen Plasma reinkubiert. Die dritte Erythrozyten-Probe wurde vor der Reinkubation bei $-80^{\circ}C$ eingefroren. Die Beendigung der Inkubation erfolgte durch Zentrifugation. In den Plasma-Proben wurde Nitrat und SNALB mittels GC-MS bestimmt. In den Erythrozytenfraktionen wurden die intrazellulären GSNO-Konzentrationen mittels HPLC bestimmt.

Ferner erfolgte eine Bestimmung von intrazellulärem Nitrat in den Erythrozyten-Lysaten mittels GC-MS.

Die Untersuchungen zur Speicherung von GSNO in Erythrozyten nach Resuspension in physiologischer NaCl-Lösung erfolgten in Analogie zu den Untersuchungen mit Plasma (s.o.). Die Unterbrechung der Inkubationen erfolgte durch Zentrifugation. In den Überständen wurden SNC und GSNO mittels HPLC bestimmt. Die Nitrat-Konzentrationen in den Überständen wurden mittels GC-MS bestimmt. Die Weiterbehandlung der Erythrozyten-Fraktionen und die Messung der intrazellulären GSNO- und SNC-Konzentrationen erfolgte in gleicher Weise wie für den Versuch mit Plasma beschrieben.

Nach Reinkubation der SNC-behandelten Erythrozyten im ursprünglichen Plasma (Abb. 51, links) konnte zu keinem Zeitpunkt SNC im Erythrozyten-Cytosol gemessen werden. Die intrazelluläre GSNO-Konzentration sank hier innerhalb weniger Sekunden von 84,0 μM auf 8,3 μM ab. Nach 2 h betrug sie noch 1 μM , zu späteren Zeitpunkten war gar kein intrazelluläres GSNO mehr meßbar. Nach Re-Inkubation der SNC-behandelten Erythrozyten in physiologischer NaCl (Abb. 51, rechts) betrug die extrazelluläre SNC-Konzentration zu Beginn ca. 2 μM . Zu späteren Zeitpunkten nahm die SNC-Konzentration im Cytosol leicht zu, um dann wieder abzunehmen. Intrazelluläres GSNO war im Cytosol von in physiologischer NaCl suspendierten Erythrozyten länger zu messen als im Cytosol von in Plasma resuspendierten Erythrozyten (Abb. 51, rechts). Während der ersten 10 min sank die intrazelluläre GSNO-Konzentration nur unwesentlich von 100 auf 93 μM ab und betrug auch nach 3 h noch 37,8 μM . In beiden Fällen betrug die cytosolische GSNO-Konzentration ca. 100 μM . Dies zeigt die gute Reproduzierbarkeit der Methode. Extrazelluläres GSNO war zu keinem Zeitpunkt weder in physiologischer NaCl-Lösung noch in Plasma meßbar.

Während beim Experiment mit in Plasma resuspendierten Erythrozyten die cytosolische Nitrat-Konzentration nach Erreichen eines Maximums nach 5 min exponentiell abnahm, stieg sie beim Experiment mit in physiologischer NaCl-Lösung resuspendierten Erythrozyten bis zu einer Inkubationszeit von 10 min weiter an und fiel dann ebenfalls exponentiell ab. Die extrazellulären Nitrat-Konzentrationen verliefen in beiden Experimenten ähnlich. Sie stiegen in Form von Sättigungs-Kurven auf Werte um 80-100 μM . Die im Plasma zu Beginn des Versuchs gemessene Nitrat-Konzentration von ca. 30 μM rührt wahrscheinlich vom endogenen, basalen Nitrat-Gehalt des Plasmas her.

Extrazelluläres SNALB (nur im Plasma, nicht gezeigt) stieg von einer basalen Konzentration von 230 nM auf 2600 nM und fiel auf einen Wert von 1200 nM nach 3 h.

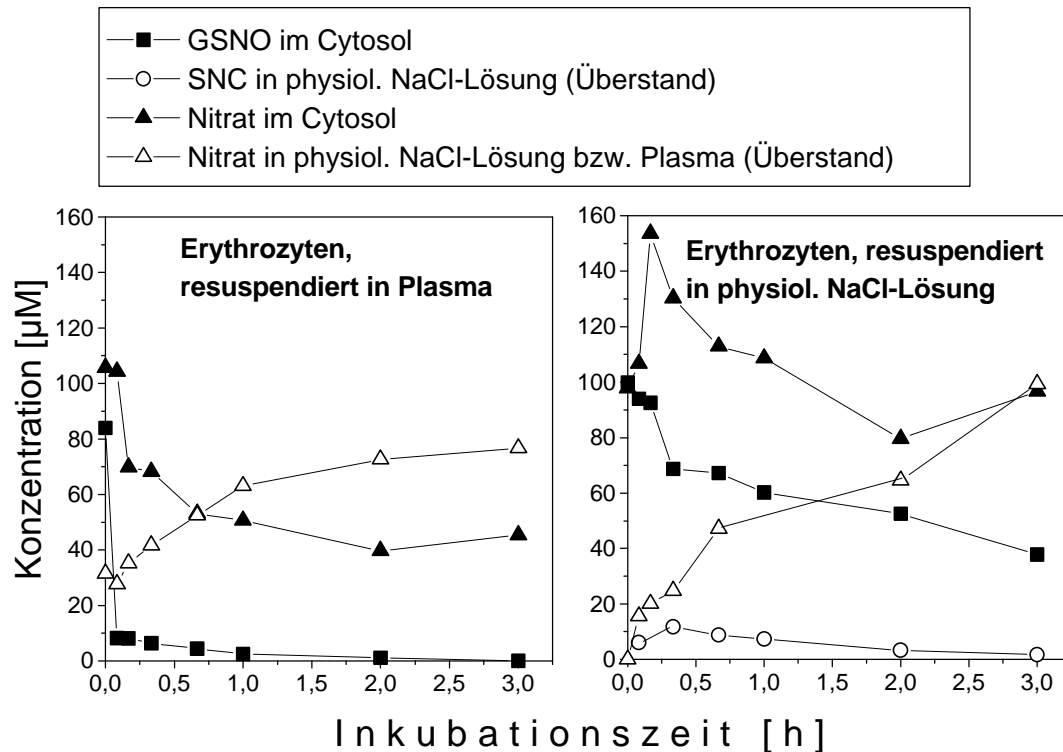


Abb. 51. Zeitlicher Verlauf der GSNO, SNC- und Nitrat-Konzentrationen im Cytosol von Erythrozyten und im Überstand, d.h. in physiologischer NaCl bzw. Plasma, nach Resuspension von Erythrozyten, die zuvor mit SNC ($600 \mu\text{M}$) für 20 min inkubiert worden waren. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Erythrozyten-Fractionen in Plasma bzw. physiologischer NaCl resuspendiert und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zentrifugation (4°C , 800 g, 5 min) beendet. Im Cytosol und in den Überständen (Plasma (links) bzw. NaCl-Lösung (rechts)) wurde die Konzentration von GSNO und SNC mittels HPLC und die von Nitrat mittels GC-MS bestimmt.

5.4.12 Metabolismus von GSNO in Blut, Plasma und gewaschenen Erythrozyten in An- und Abwesenheit von Cystein

In einer früheren Arbeit wurde beobachtet, daß GSNO in humanem Vollblut zu Nitrat metabolisiert wird [48]. In Plasma (Citrat) wurde beobachtet, daß GSNO deutlich langsamer zu Nitrit metabolisiert wird. Der Befund der vorliegenden Arbeit, daß die Inkubation von GSNO mit gewaschenen Erythrozyten zu keiner meßbaren intrazellulären GSNO-Konzentration führte (s. Kapitel 5.4.3), steht scheinbar im Widerspruch dazu. Die S-Transnitrosylierungs-Reaktion zwischen GSNO und Cystein und der nachgewiesene Transport von SNC durch die

Erythrozyten-Membran könnten aber der Mechanismus für den Metabolismus von GSNO im Blut sein. In einer Versuchsreihe wurde daher untersucht, ob Cystein den Metabolismus von GSNO im Blut beeinflusst.

Es wurden Vollblut, gewaschene Erythrozyten, resuspendiert in physiologischer NaCl-Lösung (1:1, v/v) und Plasma (mit EDTA bzw. Citrat als Anticoagulant) gewonnen. Die mit Citrat gewonnenen Matrices wurden für 1 h bei RT stengelassen, damit die Konzentration von endogenem Cystein möglichst niedrig gehalten wurde [47]. Die mit EDTA gewonnenen Matrices wurden mit 50 bzw. 100 μ M Cystein versetzt. Alle Matrices wurden mit GSNO versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Konzentrationen von Nitrit im Plasma, Überstand und Cytosol, die von SNALB im Plasma und die von GSNO im Plasma bzw. Überstand. Ferner wurden die intra- und extrazellulären Nitrat-Konzentrationen in den Ansätzen mit Vollblut bzw. gewaschenen Erythrozyten bestimmt. Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe sind in Abb. 52 und Abb. 53 dargestellt.

Die Inkubation von GSNO in Blut und gewaschenen Erythrozyten führte zur Zunahme der Nitrat-Konzentration im Plasma bzw. Überstand (Abb. 52). Dabei konnte keine deutliche Abhängigkeit von der zugesetzten Cystein-Konzentration festgestellt werden. Die Zunahmen der extrazellulären Nitrat-Konzentrationen waren in den Ansätzen mit gewaschenen Erythrozyten niedriger als in denen mit Vollblut. Das ist darauf zurückzuführen, daß extrazelluläres GSNO in Ansätzen mit gewaschenen Erythrozyten scheinbar deutlich stabiler ist als im Plasma (Abb. 53, oben). Es muß damit gerechnet werden, daß extrazelluläres GSNO, besonders in Gegenwart von Cystein, zum gemessenen extrazellulären Nitrat beitrug. Die Zunahmen der Nitrat-Konzentrationen in den Cytosol-Fractionen der Erythrozyten zeigten sowohl in den Ansätzen mit Vollblut als auch in Ansätzen mit gewaschenen Erythrozyten eine deutliche Abhängigkeit von der extern zugesetzten Cystein-Konzentration: Je mehr Cystein vorhanden war, desto größer war nach 1 h Inkubation die Nitrat-Konzentration im Cytosol der Erythrozyten.

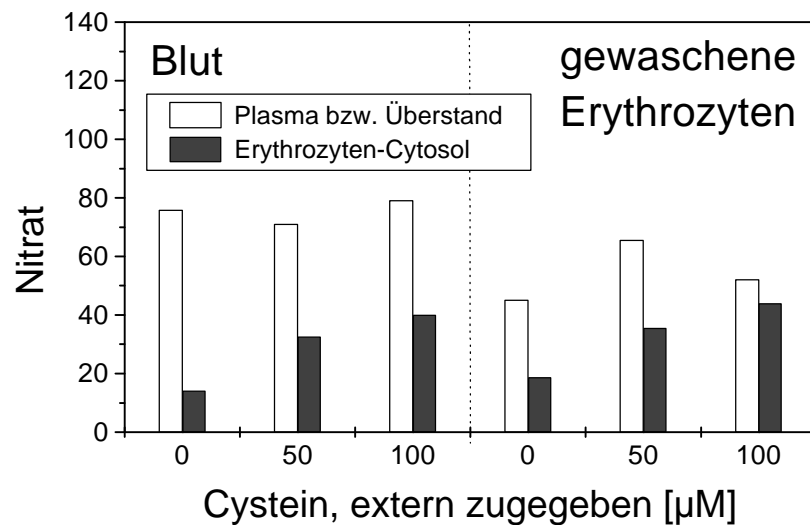


Abb. 52. Zunahmen der intra- und extrazellulären Nitrat-Konzentrationen nach Inkubation von Vollblut bzw. gewaschenen Erythrozyten, resuspendiert in physiologischer NaCl-Lösung (1:1, v/v) nach einstündiger Inkubation mit GSNO (100 µM) in Gegenwart der angegebenen Cystein-Konzentrationen. Die Angaben der zugesetzten GSNO- und Cystein-Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Ansätze, die Angaben der gemessenen Nitrat-Konzentrationen auf die Überstände bzw. das Erythrozyten-Cytosol. Die basalen Nitrat-Konzentrationen wurden von den nach 1 h Inkubation gemessenen abgezogen.

Extrazelluläres GSNO war nach 1 h Inkubation in Blut und Plasma nur zu messen, wenn den Ansätzen kein Cystein zugesetzt worden war. Die Inkubation von GSNO mit gewaschenen Erythrozyten führte dagegen zu einer ausgeprägten Cystein-abhängigen Abnahme der GSNO-Konzentration in der NaCl-Fraktion (Überstand) und zu deutlich höheren verbleibenden GSNO-Konzentrationen als in den Ansätzen mit Vollblut oder Plasma (Abb. 53, oben). Die Inkubation von GSNO in Vollblut führte zu einer deutlichen Bildung von Plasma-SNALB, dessen Konzentration mit steigender Cystein-Konzentration signifikant abnahm, während in den entsprechenden Ansätzen mit Plasma nur eine geringfügige Abhängigkeit zwischen SNALB- und Cystein-Konzentration zu beobachten war (Abb. 53, Mitte). Die Nitrit-Bildung (im Überstand) war in den Ansätzen mit gewaschenen Erythrozyten größer als in denen mit Blut. In Plasma war sie erwartungsgemäß am größten.

In allen drei Fällen nahm die Nitrit-Konzentration mit steigender Cystein-Konzentration ab, wobei dieser Effekt bei den Erythrozyten am deutlichsten war (Abb. 53, unten). Daß auch in Abwesenheit von Erythrozyten (in den Ansätzen mit Plasma) die Nitrit-Konzentration mit steigender Cystein-Konzentration abnahm, stimmt mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.1.2 gut

überein. Dort wurde gezeigt, daß auch aus SNC in wäßrigen, gepufferten Lösungen um so weniger Nitrit gebildet wird, je mehr Cystein in den Ansätzen vorhanden ist.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, daß der Metabolismus von GSNO zu Nitrat in Blut und in gewaschenen Erythrozyten durch Cystein beschleunigt wird.

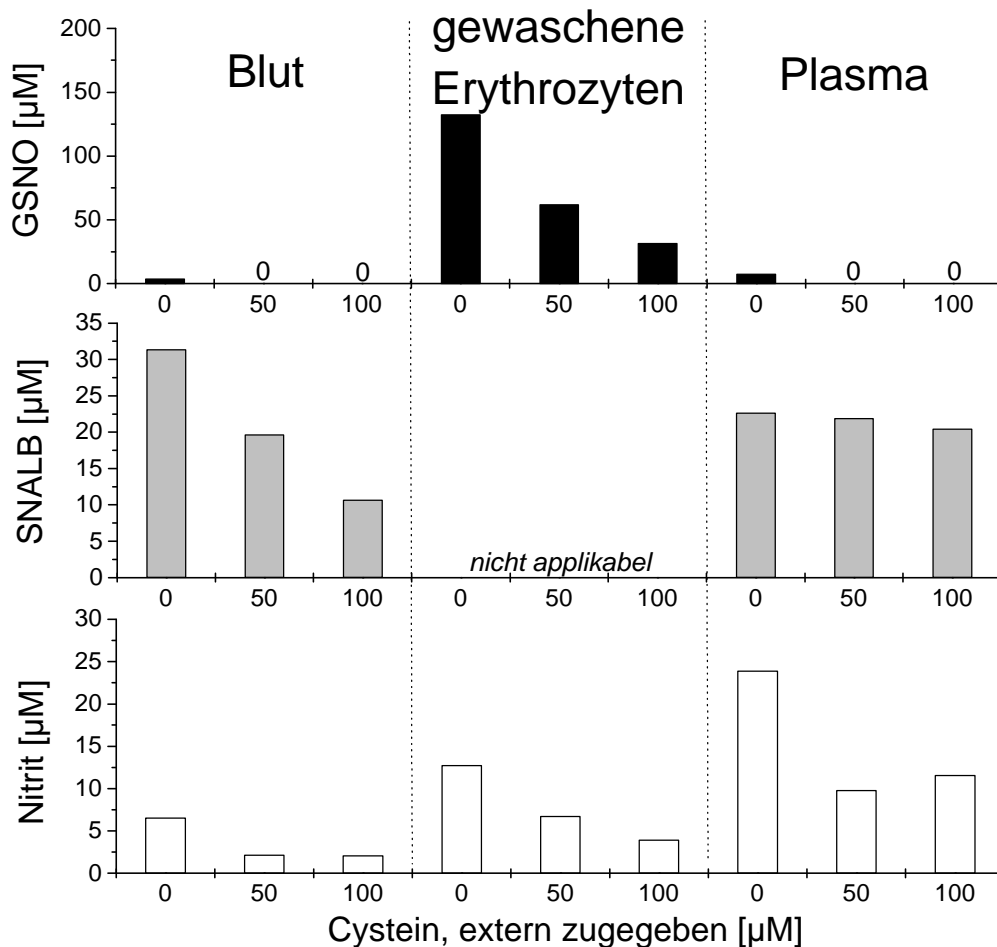


Abb. 53. Reaktionsprodukte von GSNO in Vollblut, gewaschenen Erythrozyten bzw. Plasma. Vollblut bzw. gewaschene Erythrozyten in physiol. NaCl wurden in Gegenwart der angegebenen Cystein-Konzentrationen mit 100 µM GSNO für 1 h inkubiert. Die Angaben der zugesetzten GSNO- und Cystein-Konzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Ansätze. Die Messungen fanden in den Überständen bzw. im Plasma statt. GSNO wurde durch Injektion von 200 µl-Aliquots der Überstände bzw. Plasma-Ultrafiltrate in die HPLC (System A, Eluent A, 333 nm) bestimmt. Die Analyse von SNALB in Plasma erfolgte nach Extraktion der Plasma-Proteine mittels 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen und anschließender GC-MS-Analyse (Interner Standard: 16,8 µM S¹⁵NALB). Nitrit wurde mittels GC-MS bestimmt (Interner Standard: 50 µM [¹⁵N]Nitrit).

5.4.13 Einfluß von exogenem Cystein auf den zeitlichen Verlauf der Metabolisierung von GSNO in gewaschenen Erythrozyten

Gewaschene Erythrozyten (zweimal 7,5 ml, aus EDTA-Blut) wurden im gleichen Volumen physiologischer NaCl-Lösung suspendiert. Diese und die zum Waschen der Erythrozyten-Fractionen verwendete physiologische NaCl-Lösung enthielt 1,6 mg/ml EDTA. Einer Probe wurde 10 μ M, der anderen 100 μ M Cystein zugesetzt. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von GSNO gestartet. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde je ein 3 ml-Aliquot zentrifugiert und im Überstand Nitrat und GSNO gemessen. In den Erythrozyten-Fractionen, die nur einmal nach der Inkubation gewaschen wurden, wurde die cytosolische Nitrat- und Cystein-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 54 dargestellt.

Die GSNO-Konzentrationen in den Überständen fielen in Gegenwart von 100 μ M zugesetztem Cystein wesentlich schneller ab als in Gegenwart von 10 μ M Cystein (Abb. 54 A). Die gebildeten Nitrat-Konzentrationen in den Überständen betrugen über die gesamte Inkubationszeit in den Überständen 52 ± 8 μ M und 47 ± 5 μ M (Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 8) in den Proben mit 10 bzw. 100 μ M extern zugesetztem Cystein. Im Cytosol lagen die Nitrat-Konzentrationen in Gegenwart von 10 μ M Cystein über die gesamte Inkubationszeit bei ca. 20 μ M. In Gegenwart von 100 μ M stieg die cytosolische Nitrat-Konzentration innerhalb der ersten 20 min auf einen Maximalwert von 55 μ M, fiel während der folgenden 20 min auf ca. 40 μ M und blieb dann nahezu konstant (Abb. 54 B). Die Konzentration von extrazellulärem SNC stieg in beiden Ansätzen in den ersten 10 min bzw. 20 min von 0 μ M auf einen maximalen Wert von 17,6 μ M (100 μ M Cystein) bzw. 2 μ M (10 μ M Cystein) an und fiel dann schnell wieder auf sehr niedrige Konzentrationen (100 μ M Cystein) bzw. unter die Nachweisgrenze der HPLC-Methode ab. Im Ansatz mit 10 μ M Cystein war im Überstand bereits nach 40 min kein SNC mehr detektierbar, im Ansatz mit 100 μ M Cystein dagegen erst nach 2 h (Abb. 54 C). Cystein im Erythrozyten-Cytosol erreichte im Ansatz mit 10 μ M Cystein ein Maximum von 6 μ M bei 40 min und im Ansatz mit 100 μ M Cystein ein Maximum von 65 μ M bei 90 min und fiel nach weiteren 30 min auf 40 μ M ab (Abb. 54 D).

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch, aus dem bereits hervorging, daß die Metabolisierung von GSNO in gewaschenen Erythrozyten um so schneller abläuft, je höher die Cystein-Konzentration ist. Die Daten dieses Versuchs zeigen deutlich, daß die Halbwertszeit von extrazellulärem GSNO mit steigender Cystein-Konzentration verkürzt wird. Dies liegt offenbar an der Bildung von extrazellulärem SNC, das durch

S-Transnitrosylierungs-Reaktion von GSNO mit Cystein entsteht. Das extrazelluläre SNC wird anschließend in das Cytosol der Erythrozyten transportiert, wodurch intrazellulär Cystein und Nitrat gebildet werden. Sowohl Nitrat als auch Cystein können das Erythrozyten-Cytosol wieder verlassen.

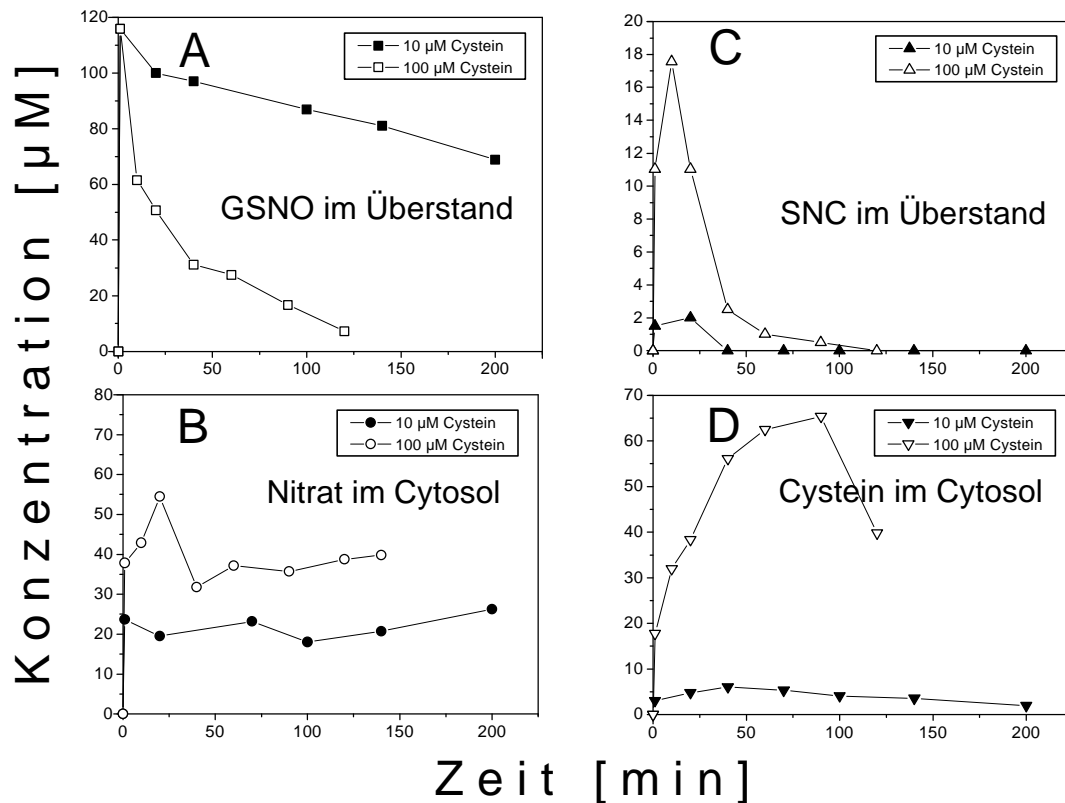


Abb. 54. Zeitliche Verläufe der GSNO- (A) Nitrit- (B) und SNC-Konzentrationen (C) in den Überständen bzw. der Cystein-Konzentration im Cytosol (D) während der Inkubation von GSNO (100 µM) in gewaschenen menschlichen Erythrozyten, suspendiert in physiologischer NaCl (1:1, v/v) mit Cystein. Die Angaben der zu den Ansätzen gegebenen GSNO- und Cystein-Konzentrationen beziehen sich auf das gesamte Volumen der Ansätze. Extrazelluläres GSNO und SNC wurden mittels HPLC (System A, Eluent A, 333 nm) gemessen. Die Bestimmung von intrazellulärem Nitrat erfolgte mittels GC-MS. Cytosolisches Cystein wurde mittels HPLC (HPLC-System A, Eluent A, 333 nm) nach Konvertierung zu SNC analysiert. Die Angaben der gemessenen Konzentrationen beziehen sich auf die angegebene Matrix (Überstand bzw. Cytosol).

5.4.14 Metabolismus von NO in gewaschenen humanen Erythrozyten

Mit einer Gas-dichten Spritze wurden unter langsamem Vortexen folgende Volumina von gasförmigem NO langsam in je 3 ml gewaschene Erythrozyten aus je 3 ml EDTA-Blut eingeleitet: 0 µl; 6,7 µl; 13,4 µl; 20 µl; 27 µl; 40 µl entsprechend NO-Konzentrationen im Blut

(bezogen auf das gesamte Volumen) von 0, 100, 200, 300, 400, 600 μM . Die Inkubationszeit betrug jeweils 10 min. Im Erythrozyten-Cytosol wurde die Nitrat-, GSNO- und GSH-Konzentration bestimmt. In keiner der Proben konnte GSNO im Cytosol gemessen werden. Die GSH-Konzentration im Erythrozyten-Cytosol ist nach einer Zugabe von 600 μM NO zu den Suspensionen der gewaschenen Erythrozyten um 416 μM gefallen, während die Nitrat-Konzentration um 324 μM angestiegen ist (Abb. 55). Inkubation von S^{15}NC (600 μM) in gewaschenen Erythrozyten führte hingegen zu keiner Abnahme von GSH neben der GS^{15}NO - und $[\text{N}^{15}]\text{Nitrat}$ -Bildung (nicht gezeigt).

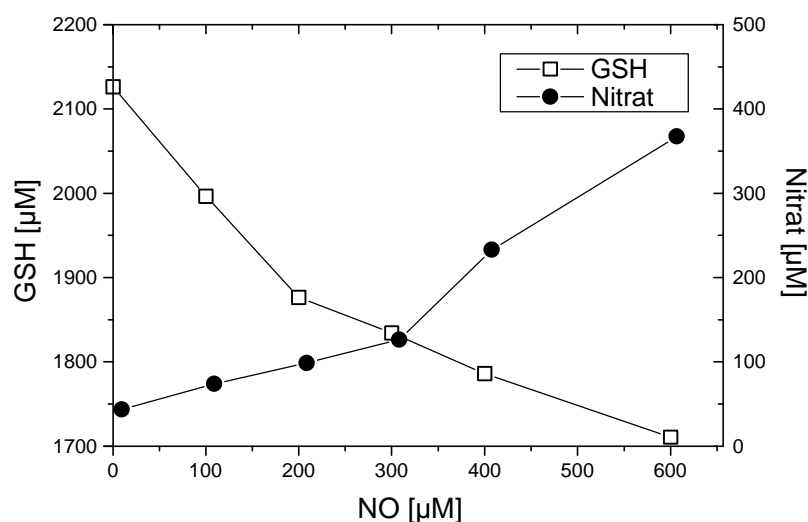


Abb. 55. GSH- und Nitrat-Konzentrationen im Cytosol von menschlichen Erythrozyten nach Inkubation von gewaschenen Erythrozyten mit NO (0-600 μM). Das NO wurde als Gas in die Ansätze eingeleitet. Die Bestimmung von cytosolischem GSH erfolgte nach Konvertierung zu GSNO mittels HPLC (System A, Eluent A, 333 nm). Die Analyse von Nitrat erfolgte mittels GC-MS.

5.5 *In vivo*-Untersuchungen zum Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen an der Ratte

Nachdem der Metabolismus und die biologische Aktivität von S-Nitroso-Substanzen *in vitro* eingehend untersucht wurden, stellt sich die Frage nach ihrem Metabolismus und ihrer biologischen Wirkung *in vivo*. Diese Untersuchungen sind vorwiegend der Gegenstand einer anderen Arbeit [147]. In der vorliegenden Arbeit wird daher nur kurz auf den Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen *in vivo* bei der Ratte eingegangen. Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde ^{14}C -markiertes SNC ($[\text{C}^{14}]\text{SNC}$) und ^{15}N -markiertes GSNO (GS^{15}NO)

eingesetzt, um Informationen über den Metabolismus sowohl des Thiol-Restes als auch der S-Nitroso-Gruppe von S-Nitroso-Substanzen zu bekommen.

5.5.1 Intravenöse Bolus-Injektion von SNC und [^{14}C]SNC in eine Ratte

Einer 460 g schweren männlichen anästhesierten (Xylazin, 2 mg/kg Körpergewicht, Ketamin, 70 mg/kg Körpergewicht) Sprague-Dawley-Ratte wurden 500 μl einer 40 μM SNC-Lösung in physiologischer NaCl, die 3874 cpm/ μl [^{14}C]SNC enthielt, in die vena cava inferior injiziert. In Zeitabständen von 1 min wurden 1-2 ml Blut mittels Citrat-Monovetten über die vena iliaca dex in einem Zeitraum von 30 s entnommen. Der Versuch wurde durch vollständige Blutabnahme nach 6 min beendet. Dem Tier wurde die Lunge, Niere, Aorta und Leber entnommen und die Radioaktivität dieser Organ-Proben (je ca. 2 g, Aorta: 0,5 g) gemessen. Die Blut-Proben wurden sofort auf Eis gelagert und am Ende des Versuchs (nach 8 min) für 5 min zentrifugiert (800 g, 4°C). In je 100 μl -Aliquots der Plasma-Fraktionen wurde die Radioaktivität gemessen. Die Erythrozyten-Fraktionen wurden einmal mit 1 ml physiologischer NaCl gewaschen, im gleichen Volumen dest. Wasser lysiert und zentrifugiert (5 min, 800 g, 4°C). Es erfolgte die Messung der Radioaktivität in je 20 μl -Aliquots der Überstände. 300 μl -Aliquots der Plasma-Proben wurden für 10 min durch Zentrifugation (4°C, 1200 g) ultrafiltriert und 200 μl -Aliquots der Ultrafiltrate in die HPLC (System A, Eluent A) injiziert, 1 min-Fraktionen gesammelt und in diesen ebenfalls die Radioaktivität gemessen.

In Abb. 56 sind die gemessenen Aktivitäten in den einzelnen Plasma- bzw. Erythrozyten-Cytosol-Fraktionen (A) und in den am Ende des Versuchs entnommenen Organen (B) dargestellt. Während die relativen Aktivitäten im Plasma mit dem Zeitpunkt der Blutabnahme kontinuierlich von 99 cpm/ μl auf 33 cpm/ μl abfielen, erreichte die relative Aktivität in den Erythrozyten-Cytosolen ein Maximum nach 2 min (21 cpm/ μl) und fiel dann kontinuierlich ab. Nach 6 min betrug die relative Aktivität im Erythrozyten-Cytosol 4,5 cpm/ μl .

In keiner HPLC-Analyse der Plasma-Proben war eine Erhöhung der Radioaktivität in den 8-min-Fraktionen (Retentionszeit von SNC) zu messen. Die größten Aktivitäten konnten in den Fraktionen mit der Retentionszeit von Cystin (11 min) und Cystein (4 min) in einem in etwa gleichen Intensitätsverhältnis gemessen werden (nicht gezeigt).

Das verzögerte Auftreten der Aktivität im Erythrozyten-Cytosol (Abb. 56 A) legt nahe, daß [^{14}C]SNC und/oder [^{14}C]Cystein und [^{14}C]Cystin aus dem Plasma in das Erythrozyten-Cytosol transportiert wurden. Daß mittels HPLC-Analyse kein [^{14}C]SNC gemessen werden konnte, könnte daran liegen, daß die Zeit bis zur Analyse trotz Kühlung und zügiger Aufarbeitung zu lang war. Diese Zeit betrug bereits bei der 1 min-Probe etwa 15 min, so daß bei der Blutabnahme eventuell vorhandenes SNC vollständig zersetzt worden wäre. Legt man die maximale Aktivität im Plasma und ein Gesamt-Blutvolumen von 8 ml zugrunde, so konnten 40,8 % der injizierten Aktivität im Plasma wiedergefunden werden. Die Analyse der Aktivitäten in den entnommenen Organen (Abb. 56 B) zeigt, daß die größten Mengen von ^{14}C -haltigen Substanzen am Ende des Versuchs in der Niere, gefolgt von Lunge und Leber, zu finden waren. In der Aorta konnten nur vergleichsweise geringe Mengen ^{14}C -haltiger Substanzen gemessen werden.

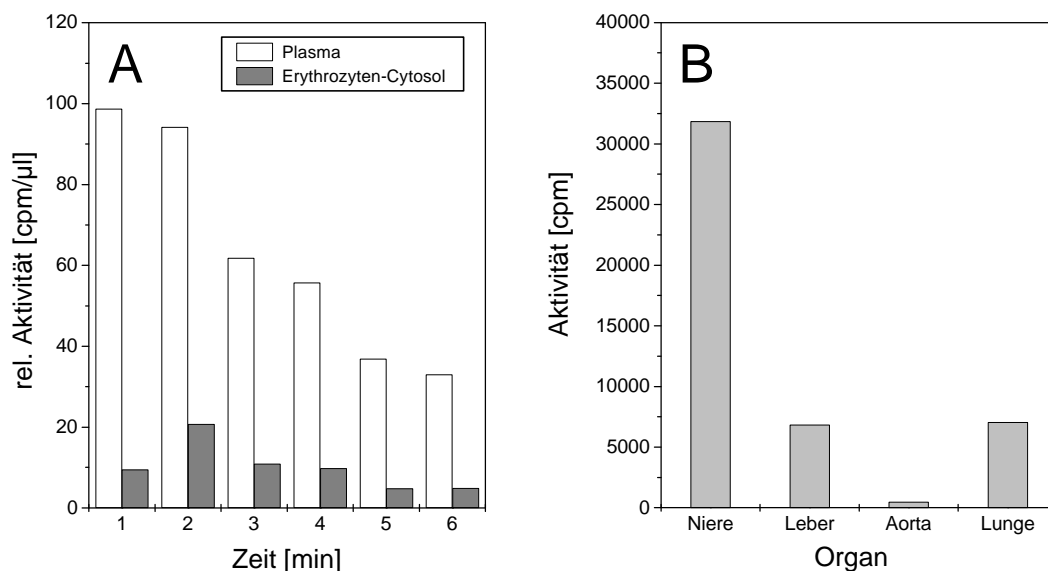


Abb. 56. (A) Relative Radioaktivitäten im Plasma bzw. im Erythrozyten-Cytosol nach i.v. Bolus-Injektion von [^{14}C]-haltigem SNC (1937000 cpm) in eine Ratte in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutabnahme. (B): Radioaktivitäten in den angegebenen Organen, die 7 min nach der Injektion entnommen wurden.

5.5.2 Langzeit-Infusion von GS ^{15}NO in eine Ratte

Einer 380 g schweren männlichen anästhesierten (Xylazin, 2 mg/kg Körpergewicht, Ketamin, 70 mg/kg Körpergewicht) Sprague Dawley-Ratte wurde zunächst 1 ml venöses Blut aus der rechten Femoral-Vene mittels EDTA-Monovette entnommen. Anschließend wurden innerhalb

von 10 s 200 µl einer pH-neutralen 10 mM GS¹⁵NO-Lösung in physiologischer NaCl i.v. in die rechte Jugular-Vene injiziert. Die Infusion der restlichen 1,2 ml der GS¹⁵NO-Lösung erfolgte über einen Zeitraum von 150 min mittels Perfusor. In Zeitabständen von 30 min wurde je ca. 1 ml Blut (150 min: 2 ml) abgenommen. Zwischen der ersten Injektion von 200 µl der GS¹⁵NO-Lösung und der Abnahme der zweiten Blutprobe lagen 3 min. Nach Beendigung der GS¹⁵NO-Infusion wurden noch über einen Zeitraum von 1 h weitere Proben (180 und 210 min) abgenommen. Die Blutproben wurden sofort zur Plasma-Gewinnung für 5 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und 300 µl-Aliquots des Plasmas über 1 ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen extrahiert. Die Kartuschen wurden zur sicheren und vollständigen Beseitigung einer möglichen GSNO- und Nitrit-Verschleppung mit je 30 ml Puffer A gespült und die Proteine dann eluiert. Die Proben wurden in Doppelbestimmung mit und ohne vorherige einstündige Inkubation mit 1 mM HgCl₂ für die Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS aufgearbeitet. Der Rest der Plasma-Proben wurde während der Aufarbeitung auf Eis gelagert und am Ende des Versuchs bei –20°C für einen Tag eingefroren.

Ein 0,3 ml-Aliquot der 150 min-Plasma-Probe wurde durch Zentrifugation (1200 g, 4°C, 5 min) ultrafiltriert. Es erfolgte die Analyse eines 200 µl-Aliquots des Ultrafiltrates mittels HPLC (System A, Eluent A) und die Bestimmung von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen in 1 min-Fractionen mittels GC-MS.

Am folgenden Tag wurden je zwei 10 µl-Aliquots der am vorigen Tag eingefrorenen Plasma-Proben mit 90 µl dest. Wasser versetzt und für die Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS aufgearbeitet. Ferner wurden 20 µl-Aliquots der Plasma-Proben mit 180 µl NH₄Cl-Puffer, pH 8,8, versetzt und diese Proben für die Nitrat-Bestimmung mittels GC-MS aufgearbeitet. Für die Extraktion nach der Derivatisierung wurden hier 300 µl Toluol verwendet. Die Durchführung der GC-MS-Analysen erfolgte in diesem Versuch ohne die Verwendung von internen Standards. Die Konzentrationsverläufe von S¹⁵NALB, [¹⁵N]Nitrit und [¹⁵N]Nitrat sind in Abb. 57 zu sehen.

S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrit stiegen nach der Bolus-Injektion sprunghaft auf ihre maximalen Plasma-Konzentrationen an (3 min-Werte, Abb. 57). Im Laufe der folgenden 60 bzw. 30 min fielen die S¹⁵NALB- bzw. [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen wieder ab und blieben dann bis zur 150. Minute konstant. Die [¹⁵N]Nitrat-Konzentration im Rattenplasma stieg kontinuierlich im Verlaufe der gesamten Infusionszeit an und erreichte ihren Maximalwert nach 150 min (Abb.

57), also am Ende der GS¹⁵NO-Infusion. Die maximalen Konzentrationen betrugen 180 nM für S¹⁵NALB, 50 nM für [¹⁵N]Nitrit und 10,7 µM für [¹⁵N]Nitrat. S¹⁵NC und GS¹⁵NO konnten in der 150 min-Plasma-Probe nicht detektiert werden.

Diese Beobachtungen zeigen, daß die Bolus-Injektion von GS¹⁵NO in die Ratte zur Bildung von S¹⁵NALB, [¹⁵N]Nitrit und [¹⁵N]Nitrat führte. Die mit Beginn der Dauer-Infusion von GS¹⁵NO abfallenden S¹⁵NALB- und [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen, aber noch steigenden [¹⁵N]Nitrat-Konzentrationen weisen auf einen Metabolismus von S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrit zu [¹⁵N]Nitrat hin. Nach 30-60 min Infusion wurde ein konstantes Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrit erreicht.

Nach Beendigung der Infusion fielen die S¹⁵NALB- und [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen wahrscheinlich durch ihre Umwandlung in [¹⁵N]Nitrat ab. Die ebenfalls abfallende [¹⁵N]Nitrat-Plasmakonzentration könnte durch Ausscheidung von [¹⁵N]Nitrat in den Urin, wie sie in anderen Arbeiten gemessen wurde [146,147], erklärt werden. Aus dem Abfall der SNALB-Konzentration nach Erreichen des Maximalwertes ermittelt sich unter Vernachlässigung der S¹⁵NALB-Neubildung durch die wesentlich langsamere GS¹⁵NO-Infusion eine *in vivo*-Halbwertszeit von etwa 20 min.

Für die Ratte kann ein Gesamt-Blutvolumen von 8 ml zugrundegelegt werden. Nimmt man an, daß die gesamte Menge injiziertes GS¹⁵NO nach 150 min in Form von [¹⁵N]Nitrat vorlag und vernachlässigt die Ausscheidung von [¹⁵N]Nitrat über die Nieren, so hätte die [¹⁵N]Nitrat-Konzentration im Plasma zu diesem Zeitpunkt 1,5 mM betragen müssen. Es konnten zu diesem Zeitpunkt jedoch nur 10,7 µM gemessen werden. Die vergleichsweise geringen S¹⁵NALB- und [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen im Plasma sind für diese Berechnung vernachlässigbar.

Es konnten also nur 0,6 % des injizierten GS¹⁵NO in Form von bekannten GS¹⁵NO-Metaboliten im Rattenplasma wiedergefunden werden. Berücksichtigt man eine konstante Ausscheidungsgeschwindigkeit des [¹⁵N]Nitrats über den Urin von 28,8 nmol/h (berechnet über den linearen Abfall der [¹⁵N]Nitrat-Konzentration nach 150 min), so wurden nur 1,13 % des injizierten GS¹⁵NO in Form von [¹⁵N]Nitrat im Plasma wiedergefunden.

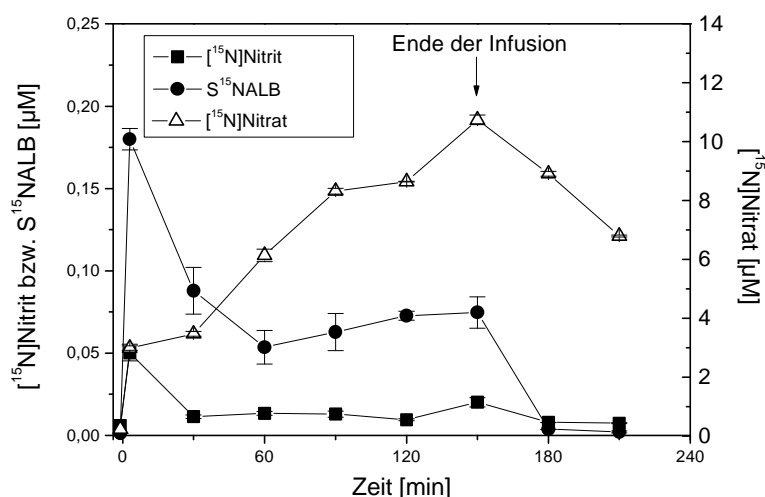


Abb. 57. Konzentrationsverläufe von [¹⁵N]Nitrit, S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrat im Plasma einer Ratte nach Bolus-Injektion von 200 μl und anschließender Dauer-Infusion von 1,2 ml einer 10 mM GS¹⁵NO-Lösung in physiologischer NaCl-Lösung bis zur 150. Minute. Die basalen Plasma-Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen betrugen 1 bzw. 40 μM, der Nitrit-Blank im Puffer A betrug 200 nM (S¹⁵NALB-Bestimmung).

5.5.3 Bestimmung von GSNO im Rattenplasma nach i.v. Infusion von GSNO

5 ml einer pH-neutralen 10 mM GSNO-Lösung in physiologischer NaCl wurden innerhalb von 20 min intravenös in die rechte Jugular-Vene einer anästhesierten (Xylazin, 2 mg/kg Körpergewicht, Ketamin, 70 mg/kg Körpergewicht), 400 g schweren Sprague-Dawley-Ratte infundiert. Vor und nach der Infusion wurden je 2 ml venöses Blut aus der rechten Femoral-Vene mittels EDTA-Monovetten entnommen. Das Blut wurde für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert, das Plasma mit DTPA (600 μM) versetzt und durch Zentrifugation (1200 g, 4°C, 5 min) ultrafiltriert. Das GSNO wurde durch HPLC-Analyse eines 200 μl-Aliquots (System B, Eluent D) isoliert. Je zwei 50 μl-Aliquots der gesammelten HPLC-Fraktion von GSNO wurden in Borat-Puffer verdünnt (1:20, v/v) und je 4 μl 212 mM NEM zugesetzt.

Eine Probe (1 ml) wurde mit OPA-Reagenz A (100 μl) für 2 min inkubiert und ein 200 μl-Aliquot sofort mit HPLC-System B, Eluent D unter Verwendung des Fluoreszenz-Detektors analysiert. Die andere Probe wurde für 40 min mit OPA-Reagenz B (100 μl) inkubiert und nach 40 min mit dem gleichen HPLC-System analysiert. Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 58 zu sehen.

Vor der Infusion konnte kein endogenes GSNO gemessen werden (nicht gezeigt). Die GSH-Konzentration im Rattenplasma nach 20-minütiger Infusion von GSNO betrug 130 μM . Für die GSH-Bestimmung wurde HPLC-System A und Eluent A verwendet. Das Fehlen eines Peaks mit der Retentionszeit von GSH (7,2 min) im linken Chromatogramm der Abb. 58 zeigt, daß das GSH durch die vorherige Isolierung der GSNO-Fraktion und durch die Behandlung mit NEM vollständig entfernt wurde. Die Konzentration von GSNO im Rattenplasma betrug am Ende der Infusion 60 μM . Daß in diesem Versuch GSNO im Rattenplasma in einer relativ hohen Konzentration gemessen wurde, ist wahrscheinlich auf die nahezu 25-fach höhere Infusionsrate von GSNO im Vergleich zu vorigen Versuchen zurückzuführen (6,25 gegen 0,25 $\mu\text{mol GSNO/kg Körpergewicht} \cdot \text{min}$).

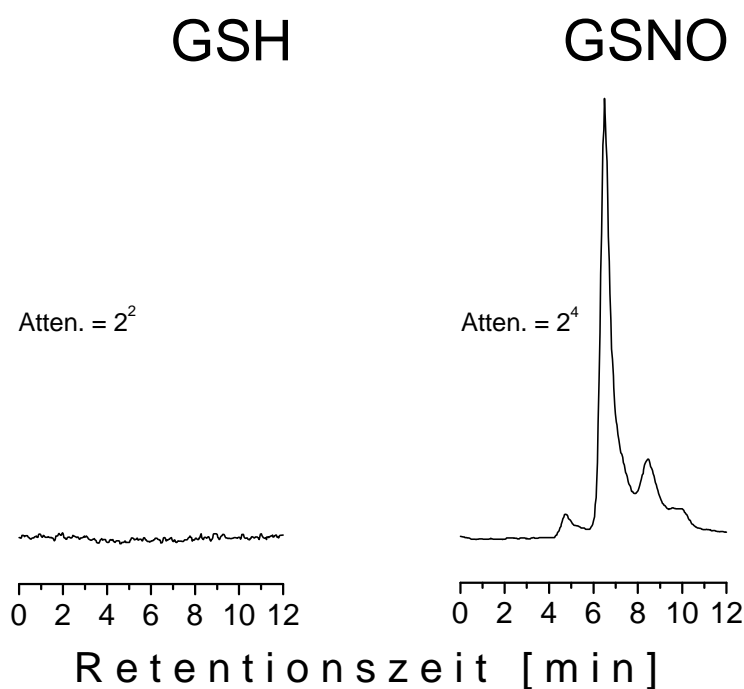


Abb. 58. HPLC-Chromatogramme (HPLC-System B, Eluent D, 1,4 ml/min Flußrate, Fluoreszenz) der Analysen von GSNO in Rattenplasma-Ultrafiltraten nach i.v. Infusion von GSNO (125 $\mu\text{mol/kg Körpergewicht}$) in eine Ratte über einen Zeitraum von 20 min. Linkes Chromatogramm: 2 min Derivatisierung mit OPA-Reagenz A. Rechtes Chromatogramm: 40 min Derivatisierung mit OPA-Reagenz B. Vor der Derivatisierung mit den OPA-Reagenzien wurden die HPLC-Fractionen mit der Retentionszeit von GSNO aus den Ultrafiltraten mit dem gleichen HPLC-System gesammelt, verdünnt und für 2 min mit 480 μM NEM inkubiert. Die Abwesenheit eines Peaks im linken Chromatogramm zeigt, daß GSH die Analyse von GSNO (rechtes Chromatogramm) nicht störte.

5.6 Vorkommen von endogenen S-Nitroso-Substanzen im Plasma und in Erythrozyten von Menschen

Über die Konzentrationen von endogenen S-Nitroso-Substanzen in menschlichem Blut existierten zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur wenige Publikationen [6,64]. Die von Stamler *et al.* publizierte Konzentration von SNALB in Human-Plasma von $7 \pm 5 \mu\text{M}$ wurde bereits in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Diplomarbeit [59] angezweifelt. Mit den in der vorliegenden Arbeit entwickelten bzw. weiterentwickelten Methoden wurde der Versuch unternommen, weitere Daten über die endogenen Konzentrationen von S-Nitroso-Substanzen im menschlichen Blut zu bekommen.

In Tab. 5 sind die endogenen SNALB- und Nitrat-Plasma-Konzentrationen, die bei gesunden Menschen und Menschen, die an verschiedenen Lebererkrankungen bzw. an chronischem Nierenversagen erkrankt waren, mit der hier vorgestellten Methode der SNALB-Bestimmung gemessen wurden. Als Qualitätskontroll-Probe wurde zu je einer Plasma-Probe aus jeder Spender-Gruppe SNALB in einer Konzentration von 2 und 5 μM zugegeben und parallel analysiert. Die mittlere *accuracy* und *imprecision* der Qualitätskontroll-Proben betrug 93 % bzw. 10,5 % in den Proben mit 2 μM zugesetztem SNALB und 104 % bzw. 7,5 % in den Proben mit 5 μM zugesetztem SNALB.

Mit Ausnahme von 3 Menschen mit Lebererkrankung (zweimal 1000, einmal 2000 nM) lagen alle Plasma-Konzentrationen von SNALB im Bereich von 0-560 nM. Es konnte in keiner Spender-Gruppe eine Korrelation zwischen den Plasma-SNALB- und Plasma-Nitrat-Konzentrationen festgestellt werden. Auch zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der SNALB-Plasmakonzentration. Die in der vorliegenden Arbeit bei gesunden Probanden gemessenen SNALB-Plasmakonzentrationen von $181 \pm 150 \text{ nM}$ sind um einen Faktor von 40 kleiner als die von Stamler *et al.* gemessenen Werte von $7 \pm 5 \mu\text{M}$ in einem Kollektiv von 5 gesunden Probanden [6]. In keiner der Plasma-Proben von gesunden Spendern war die Plasma-SNALB-Konzentration so hoch wie von Stamler *et al.* berichtet. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen SNALB-Plasma-Konzentrationen wurden durch die Messungen von Nitrit in frischem, unbehandeltem Plasma von vier gesunden Probanden untermauert: Die Nitrit-Konzentrationen betrugen $1,38 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ohne HgCl_2 und $1,53 \pm 0,13 \mu\text{M}$ mit HgCl_2 . In den entsprechenden Ultrafiltrat-Proben wurden $1,35 \pm 0,22 \mu\text{M}$ ohne HgCl_2 und $1,33 \pm 0,12 \mu\text{M}$ Nitrit mit HgCl_2 gemessen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von

einer anderen Arbeitsgruppe für die Summe von Nitrit und S-Nitroso-Substanzen angegeben [148]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß SNALB und möglicherweise niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen im Plasma nur in Konzentrationen im unteren nM-Bereich physiologisch vorkommen. Auch im Cytosol von Erythrozyten von gesunden Spendern ($n = 12$) konnte im Rahmen dieser Arbeit kein endogenes GSNO gemessen werden (nicht gezeigt).

Tab. 5. SNALB- und Nitrat-Konzentrationen im Plasma von gesunden und kranken Spendern.

Spender-Gruppe	SNALB [nM] (MW \pm SD)	Nitrat [μ M] (MW \pm SD)
Gesunde ($n = 23$)	181 ± 150	$35,6 \pm 15,2$
Patienten mit Lebererkrankungen ($n = 40$)	161 ± 274	$56,5 \pm 41,5$
Patienten mit chronischem Nierenversagen ($n = 6$)	147 ± 55	$68,8 \pm 20,1$

SNALB wurde in ultrafiltrierten Protein-Fractionen (nach Extraktion von Plasma über HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen) gemessen; Nitrat wurde in nativem Plasma quantifiziert.

5.7 Reaktionsprodukte der neuronalen NO-Synthase bei der Inkubation von Arginin in Gegenwart und Abwesenheit von GSH

Von zwei Arbeitsgruppen wurde berichtet, daß GSNO ein Produkt von nNOS ist [13, 14]. Die Angaben über den Anteil von GSNO an den Produkten der NOS unterscheiden sich jedoch erheblich. Während Meyer *et al.* [14] von einem Anteil von ca. 30 % des gleichzeitig aus Arginin gebildeten Citrullins berichten, beträgt dieser nach Schmidt *et al.* [13] nur 5 %. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Interferenz-freie Methode zur simultanen Bestimmung von GS¹⁵NO und [¹⁵N]Nitrit in Ansätzen von L-[¹⁵N₂]Arginin mit isolierter nNOS entwickelt. Die damit erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

5.7.1 Inkubation von NOS mit L-[¹⁵N₂]Arginin in Gegenwart von GSH

Es wurden 5 ml eines Ansatzes mit GSH, NADPH, CaM, CaCl₂ und L-[¹⁵N₂]Arginin hergestellt. Dieser Ansatz wurde in 1 ml-Aliquots unterteilt. Nach 10 min Vorinkubation bei 37°C wurde NOS zugesetzt, und zwar je zweimal in einer Konzentration von 0,5 bzw. 1 μ g/ml, und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Von jedem Ansatz wurde ein 100 μ l-Aliquot mit 400 μ l eiskaltem Aceton versetzt und mittels GC-MS die [¹⁵N]Nitrit-Konzentration bestimmt. 200 μ l-Aliquots der Ansätze wurden sofort auf die HPLC injiziert (HPLC-System B, Eluent D) und bis zu einer Retentionszeit von 4,5 min 15 s Fraktionen gesammelt. Die Analyse von

GS¹⁵NO erfolgte durch Behandlung der HPLC-Fractionen mit HgCl₂ (1 mM) und GC-MS-Analyse von [¹⁵N]Nitrit. Die gemessenen Peakflächenverhältnisse von m/z 47 und m/z 46 wurden gegen die Retentionszeit aufgetragen.

Die [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen in den Ansätzen betrugen nach 10 min $0,59 \pm 0,15 \mu\text{M}$ in den Ansätzen mit 5 μg NOS/ml und $1,29 \pm 0,10 \mu\text{M}$ in den Ansätzen mit 10 μg NOS/ml. Die Chromatogramme der Abb. 59 zeigen einen erheblichen Anstieg des Peakflächenverhältnisses zur Retentionszeit von Nitrit (2,5 min) und einen sehr leichten Anstieg zur Retentionszeit von GSNO (3,5 min) bei beiden verwendeten NOS-Konzentrationen. Es wird deutlich, daß die GS¹⁵NO-Konzentrationen um mehrere Größenordnungen niedriger sind als die entsprechenden [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen. Zur ungefähren Quantifizierung von GS¹⁵NO in den Ansätzen wurden die Peakflächen von GS¹⁵NO (3,25.-3,75. Minute) und [¹⁵N]Nitrit (2.-3. Minute) in den Chromatogrammen von Abb. 59 integriert und ihr Verhältnis mit den mittels GC-MS bestimmten [¹⁵N]Nitrit-Konzentrationen multipliziert. Daraus berechnen sich die GS¹⁵NO-Konzentrationen zu 29 (5 μg NOS/ml) bzw. 42 nM (10 μg NOS/ml).

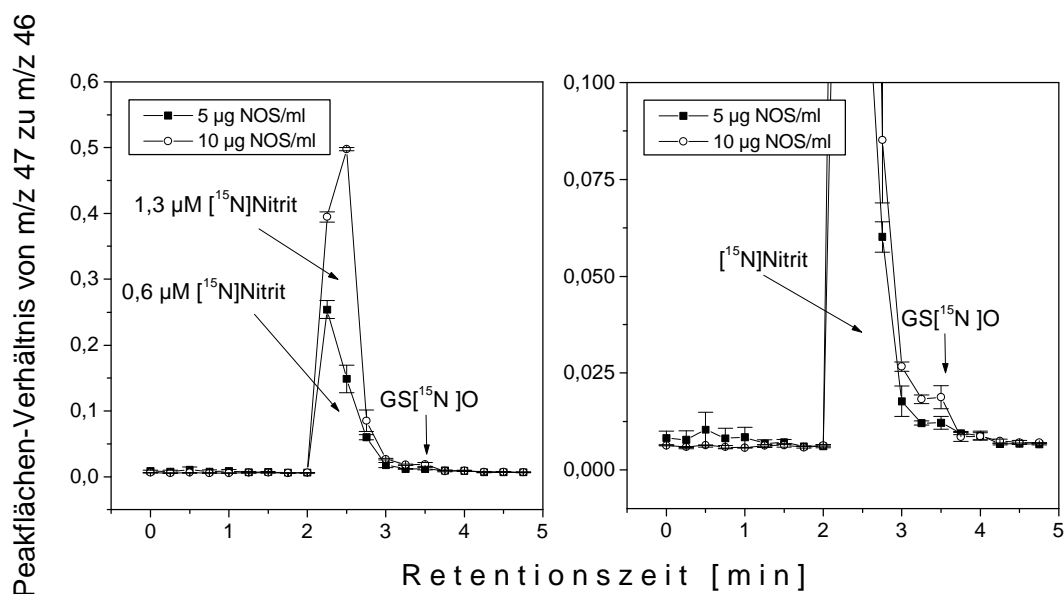


Abb. 59. Peakflächenverhältnisse von m/z 47 zu m/z 46, gemessen in 15 s HPLC-Fractionen (System B, Eluent D) aus NOS-Ansätzen (5 bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die L-[¹⁵N₂]Arginin (100 μM), NADPH (50 μM), CaM (600 nM), CaCl₂ (600 μM) und 1 mM GSH enthielten und für 10 min inkubiert wurden. Die rechte Seite stellt das Chromatogramm der linken Seite mit 6-fach empfindlicherer Skalierung der y-Achse dar. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen. Die angegebenen Nitrit-Konzentrationen sind separat mittels GC-MS bestimmt worden.

Diese Ergebnisse stehen in krassem Widerspruch zu den Ergebnissen von Mayer *et al.* [14], die unter gleichen Bedingungen eine GSNO-Bildung von 3 μM gemessen haben. Anders als in der vorliegenden Arbeit hat diese Arbeitsgruppe ein HPLC-System eingesetzt, dessen mobile Phase einen pH-Wert von 3 hatte. Da unter solchen Bedingungen und in Gegenwart einer hohen GSH-Konzentration (1 mM) mit einer artifiziellen Bildung von GSNO in beträchtlichen Mengen zu rechnen ist [48], wurden NOS-Ansätze mit allen Cofaktoren, GSH und zwei L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin-Konzentrationen eingesetzt, für 30 min inkubiert und 200 μl -Aliquots davon mit HPLC-System A (Eluent A, pH 2) und HPLC-System B (Eluent D, pH 7,0) analysiert. Abb. 60 zeigt eine beträchtliche Bildung von GS ^{15}NO in den L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin und NOS enthaltenden Ansätzen, die mit HPLC-System A analysiert wurden.

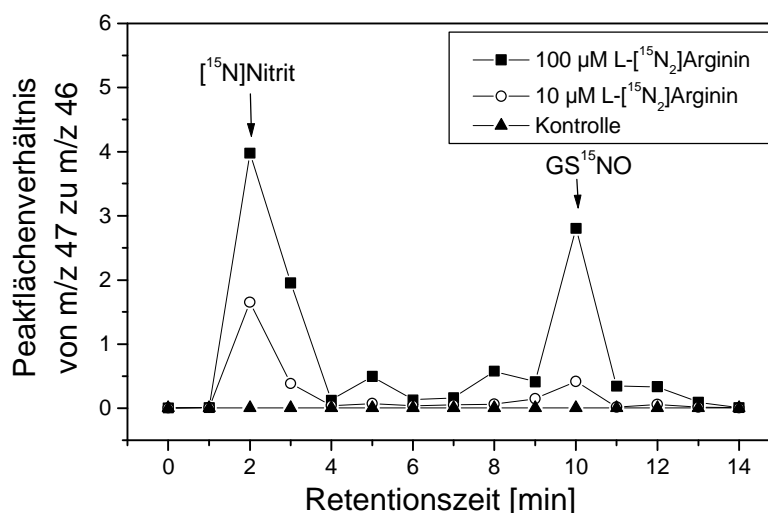


Abb. 60. Peakflächenverhältnisse von m/z 47 zu m/z 46, gemessen in 1 min-HPLC-Fraktionen (System A, Eluent A) aus NOS-Ansätzen (13 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin (10 und 100 μM), NADPH (800 μM), CaM (500 nM), CaCl_2 (500 μM), FAD (5 μM), FMN (5 μM), H_4Bip (10 μM) und 1 mM GSH enthielten und für 30 min inkubiert wurden. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit der oben angegebenen Zusammensetzung und 100 μM L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin, jedoch ohne NOS.

Man beachte, daß die Höhe der GS ^{15}NO -Peaks größenordnungsmäßig mit den [^{15}N]Nitrit-Peaks übereinstimmt, was in den in Abb. 59 dargestellten Chromatogrammen nicht der Fall ist. Eine Auswertung der UV-Signale (333 nm) aus diesen HPLC-Analysen führte zu dem Ergebnis, daß die GS ^{15}NO -Konzentrationen in den Ansätzen 8,5 μM (100 μM L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin) bzw. 0,8 μM (10 μM L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin) betrugen. Die entsprechenden [^{15}N]Nitrit-Kon-

zentrationen in den Ansätzen betrugen 34,2 bzw. 3,7 μM . Mit dem HPLC-System B wurde hingegen keine signifikante GS^{15}NO -Bildung in diesen Proben gemessen (nicht gezeigt). Eine 30-minütige Inkubation von 34 μM [^{15}N]Nitrit mit 3 mM GSH bei 37°C führte nach Analyse mittels HPLC-System A zur Bildung von GS^{15}NO in einer Konzentration von 7,7 μM , nach Analyse mittels HPLC-System B hingegen zu keiner signifikanten GSNO-Bildung.

Die von Mayer *et al.* [14] gemessene Bildung von GSNO in GSH-haltigen NOS-Ansätzen könnte daher, zumindest zum Teil, artifizieller Natur sein. Eine weitere Erklärung für diese Diskrepanz könnte auch die zeitliche Abnahme der GSNO-Konzentration im NOS-Ansatz unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit sein. Diese Möglichkeit wurde im folgenden Versuch untersucht.

5.7.2 Stabilität von GS^{15}NO in NOS-Ansätzen

Es wurden 1,5 ml eines kompletten Ansatzes in Puffer A nach 10 min Vorinkubation bei 37°C mit NOS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und GS^{15}NO (10 μM) versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 200 μl -Aliquots mit GS^{14}NO (50 μM) versetzt, mittels HPLC (System B, Eluent D, 333 nm) analysiert und die GSNO-Fraktion (2:55 min bis 3:35 min, ca. 700 μl) gesammelt. Als Blindprobe wurde ein Ansatz mit der oben angegebenen Zusammensetzung, jedoch ohne GS^{15}NO , wie oben behandelt und die GSNO-HPLC-Fraktion gesammelt. Zur Umwandlung von GSNO in Nitrit wurden in den Auffang-Röhrchen je 10 μl 100 mM HgCl_2 vorgelegt. Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte die Aufarbeitung und Analyse von jeweils zwei 100 μl -Aliquots für die Nitrit-Bestimmung mittels GC-MS. Die in der Blindprobe gemessene GS^{15}NO -Konzentration (0,2 μM) wurde von den in den Proben gemessenen GS^{15}NO -Konzentrationen abgezogen.

Abb. 61 zeigt den Verlauf der GS^{15}NO -Konzentration in den NOS-Ansätzen. Die Konzentration nahm im Zeitraum von 60 min von 9,2 auf 3,7 μM ab. Nach 10 min sind unter den Bedingungen der NOS-Inkubation noch 84 %, nach 30 min Inkubation noch 67 % des eingesetzten GS^{15}NO vorhanden. Somit sind die in den oben geschilderten Versuchen gemessenen geringen GS^{15}NO -Konzentrationen in NOS-Inkubationen in Gegenwart von GSH nur unwesentlich auf die Abnahme der GSNO-Konzentration unter diesen Bedingungen zurückzuführen.

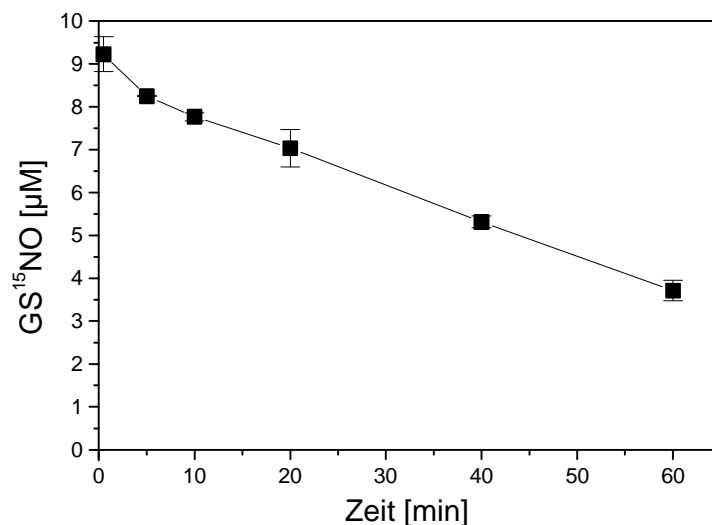


Abb. 61. Stabilität von GS¹⁵NO in NOS-Inkubations-Ansätzen. Die Ansätze enthielten 1 mM GSH, 50 µM NADPH, 600 nM Calmodulin und 600 µM CaCl₂ und 10 µg/ml NOS in Puffer A. Die Analyse von GS¹⁵NO nach den angegebenen Inkubationszeiten erfolgte durch Zugabe von 50 µM GS¹⁴NO als interner Standard, Isolierung der GSNO-Fractionen mittels HPLC und deren Analyse mittels GC-MS auf Nitrit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD aus Doppelbestimmungen. Zur genauen Vorgehensweise siehe Text. Die gewählten Bedingungen entsprechen denen von Mayer *et al.* [14].

5.7.3 Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in NOS-Ansätzen

Es wurden 5 ml eines Ansatzes, bestehend aus allen Cofaktoren und 100 µM L-[¹⁵N₂]Arginin in Puffer A, hergestellt und in zwei 2,5 ml-Aliquots unterteilt. Einer der beiden Proben wurde GSH (1 mM) zugesetzt. Beide Ansätze wurden in je vier 600 µl-Aliquots unterteilt. Je zwei dieser Aliquots wurden zusätzlich mit 50 µM NADPH bzw. 800 µM NADPH versetzt. Die Proben wurden jeweils für 10 min bei 37°C vorinkubiert und die Reaktion mit NOS (10 µg/ml) gestartet. Nach 10 min erfolgte die Zugabe je eines 100 µl-Aliquots zu 400 µl eiskaltem Aceton und Analyse mittels GC-MS. Zusätzlich wurde je ein 100 µl-Aliquot eines kompletten Ansatzes, jedoch ohne NOS, als Kontrolle wie oben behandelt und analysiert.

Abb. 62 zeigt, daß die [¹⁵N]Nitrit- und [¹⁵N]Nitrat-Konzentrationen in den Ansätzen mit 800 µM NADPH erheblich höher waren als in den Ansätzen mit nur 50 µM NADPH. In Gegenwart von GSH war die gemessene [¹⁵N]Nitrit-Konzentration jedoch erheblich größer als in Abwesenheit von GSH. Dabei war der Einfluß von GSH auf die [¹⁵N]Nitrat-Bildung erheblich geringer als auf die [¹⁵N]Nitrit-Bildung. In den Ansätzen ohne GSH war die [¹⁵N]Nitrat-Bildung aus L-[¹⁵N₂]Arginin sowohl bei 800 als auch bei 50 µM NADPH gegenüber der

[^{15}N]Nitrit-Bildung bevorzugt. Die Ansätze mit GSH enthielten jeweils annähernd gleiche [^{15}N]Nitrit- und [^{15}N]Nitrat-Konzentration.

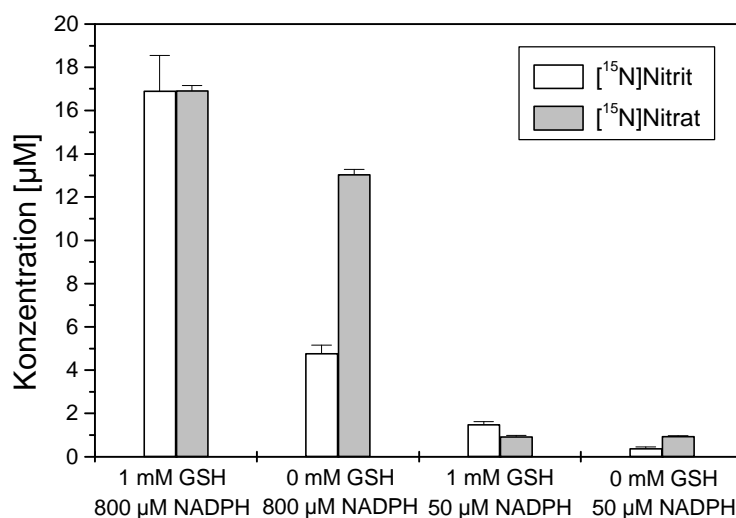


Abb. 62. Konzentrationen von [^{15}N]Nitrit und [^{15}N]Nitrat nach zehnminütiger Inkubation von L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin (100 μM) mit NOS (10 $\mu\text{g/ml}$), Calmodulin (500 nM) CaCl_2 (100 μM), $\text{H}_4\text{-Bip}$ (10 μM), FAD (5 μM) und FMN (5 μM) und den angegebenen Konzentrationen von NADPH und GSH in Puffer A. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-MS. Als interne Standards wurden 50 μM Nitrit bzw. 100 μM Nitrat verwendet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

5.7.4 Messung von NO in NOS-Ansätzen

In kompletten NOS-Ansätzen (1 ml) mit den üblichen Konzentrationen aller Cofaktoren in Puffer A sowie L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin (40 μM) und NOS (13 $\mu\text{g/ml}$) konnte mittels NO-Sensor kein NO detektiert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NOS gestartet. Es kam dabei zwar zu einer leichten Erhöhung der an der Elektrode gemessenen Spannung. Dies geschah jedoch auch in Ansätzen, die kein L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin enthielten (nicht gezeigt).

5.8 Unterscheidung zwischen GSNO und GSNO₂

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde berichtet, daß aus der Reaktion von Peroxynitrit mit GSH nicht GSNO, sondern S-Nitroglutathion (GSNO₂) entsteht [50]. Es wurde darüber hinaus berichtet, daß GSNO und GSNO₂ mittels HPLC nicht unterschieden werden können. Es wurde daher hier der Versuch unternommen, eine Methode zu finden, mit der zwischen

GSNO und GSNO₂ unterschieden werden kann oder gar ihre simultane Quantifizierung möglich ist.

Zur Herstellung von GSNO₂ wurde 1 ml einer 10 mM GSH-Lösung in dest. Wasser mit ca. 20 mg Nitronium-Tetrafluoroborat (NO₂BF₄) bei RT umgesetzt. Diese Lösung wurde mit Eluent A aufgenommen (1:10, v/v), ein 200 µl-Aliquot auf die HPLC (System A, Eluent A) injiziert und die GSNO₂-Fraktion (ca. 1,5 ml, 8,633 min) gesammelt. Dem gesammelten Peak wurde sofort zur Stabilisierung DTPA (81 µM) zugesetzt. Zur ungefähren Quantifizierung unter der Annahme, daß GSNO und GSNO₂ den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten bei 333 nm haben, wurde als Vergleich ein 200 µl-Aliquot einer Lösung von GSNO (238 µM) in Eluent A mittels HPLC injiziert (System A, Eluent A) und analysiert. Anhand der GSNO-Peakfläche ermittelte sich die Konzentration des verdünnten (injizierten) GSNO₂-Reaktionsansatzes zu 481 µM. Eine GSNO-Stammlösung wurde in Eluent A auf die gleiche Konzentration (481 µM) verdünnt und in die HPLC injiziert. Der GSNO-Peak (ca. 1,5 ml, 8,798 min) wurde ebenfalls gesammelt und mit DTPA (81 µM) versetzt. Sofort nach Gewinnung der GSNO- bzw. GSNO₂-Fraktion wurde je ein 800 µl-Aliquot mit [¹⁵N]Nitrit und [¹⁵N]Nitrat (je 100 µM) versetzt. Es erfolgte jeweils die Zugabe von HgCl₂ (1 mM) bzw. Dithiothreitol (1 mM) zu je zwei 100 µl-Aliquots dieser Lösungen und die sofortige GC-MS-Bestimmung von Nitrit und Nitrat (Analyse der Peakflächenverhältnisse von m/z 46 zu m/z 47 (Nitrit als PFB-Derivat) bzw. m/z 62 zu m/z 63 (Nitrat als PFB-Derivat). Ferner wurden je zwei 100 µl-Aliquots der gesammelten GSNO-bzw. GSNO₂-Fraktion ohne Zugabe weiterer Reagenzien derivatisiert und mittels GC-MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 63 dargestellt.

Die ohne Zugabe weiterer Reagenzien derivatisierten GSNO-Fractionen wurden als Kontrollproben verwendet. Die in ihnen gemessenen Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen betrugen $3,9 \pm 0,2$ µM bzw. $11,7 \pm 0,3$ µM. Die GSNO₂-Fraktion, die auf die gleiche Weise behandelt wurde, enthielt hingegen nach Abzug der Blindwerte praktisch kein Nitrit ($0,3 \pm 0,4$ µM), aber $14,3 \pm 0,2$ µM Nitrat. Die Derivatisierung der GSNO-Fraktion in Gegenwart von HgCl₂ führte zur Bildung von $48,2 \pm 0,7$ µM Nitrit. Nitrat wurde aus GSNO unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß praktisch nicht gebildet ($1,3 \pm 0,8$ µM). In der entsprechenden GSNO₂-Fraktion wurde hierbei stattdessen $49,3 \pm 1,3$ µM Nitrit und $16,9 \pm 1,7$ µM Nitrat gemessen. Geht man von einer quantitativen Umsetzung von GSNO zu Nitrit und GSNO₂ zu

Nitrit und Nitrat in Gegenwart von HgCl_2 aus, so resultiert daraus, daß GSNO_2 eine etwa 34 % größere molare Absorption als GSNO bei 333 nm hat. Ähnliche Daten wurden auch in der Literatur [50] beschrieben. Die Nitrat-Freisetzung aus GSNO_2 ist offenbar unabhängig von der Anwesenheit von HgCl_2 . In Gegenwart von Dithiothreitol entstand aus GSNO nur Nitrit, während aus GSNO_2 kleine Mengen von Nitrit und Nitrat entstanden (Abb. 63).

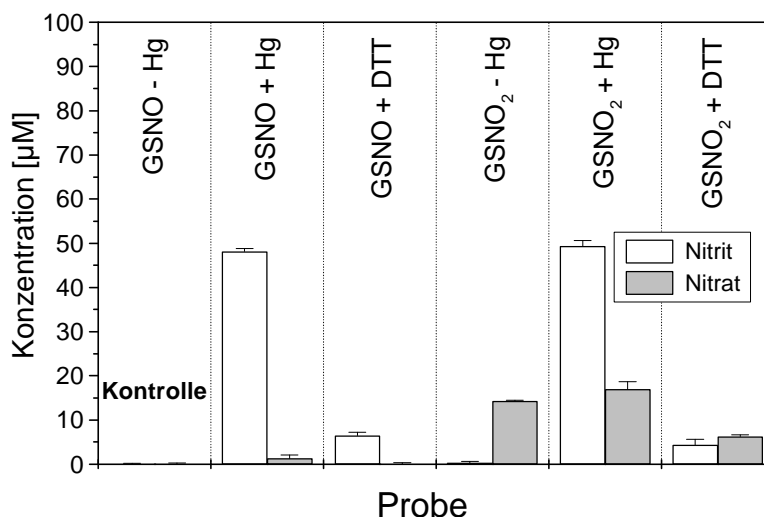


Abb. 63. Bildung von Nitrit und Nitrat in Ansätzen von GSNO und GSNO_2 in Eluent A in Gegenwart von HgCl_2 (1 mM) bzw. 1 mM Dithiothreitol (DTT, 1 mM) bzw. ohne Zugabe dieser Reagenzien. Als interne Standards dienten je 100 µM ^{15}N -Nitrit und ^{15}N -Nitrat. Die in der Kontroll-Probe gemessenen Konzentrationen wurden von allen anderen Konzentrationen abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

In einem weiteren Versuch wurde wie folgt vorgegangen: Ein 200 µl-Aliquot eines Gemisches aus je 200 µM GS^{15}NO und 200 µM GSNO_2 in Eluent A wurde mittels HPLC (System A, Eluent A) analysiert und der $\text{GS}^{15}\text{NO}/\text{GSNO}_2$ -Peak gesammelt.

Ein 25 µl-Aliquot der $\text{GS}^{15}\text{NO}/\text{GSNO}_2$ -Fraktion wurde mit NH_4Cl -Puffer verdünnt (1:1, v/v). Davon wurde ein 25 µl-Aliquot mit 25 µl H_2^{18}O versetzt. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 6,5. Es wurde HgCl_2 (1 mM) zugesetzt und diese Probe sofort analog zur GC-MS-Bestimmung von Nitrit unter Verwendung von jeweils der Hälfte aller benötigten Reagenzien aufgearbeitet. Zur Auswertung der GC-MS-Chromatogramme wurden die Peakflächenverhältnisse

von m/z 46 (NO_2^-) zu m/z 48 (ON^{18}O^-) und m/z 47 ($^{15}\text{NO}_2^-$) zu m/z 49 ($\text{O}^{15}\text{N}^{18}\text{O}^-$) berechnet.

Das Peakflächenverhältnis von m/z 46 zu m/z 48 und somit auch das Konzentrationsverhältnis von NO_2^- zu ON^{18}O^- betrug 1,48. Das Peakflächenverhältnis von m/z 47 zu m/z 49 und somit auch das Konzentrationsverhältnis von $^{15}\text{NO}_2^-$ zu $\text{O}^{15}\text{N}^{18}\text{O}^-$ betrug 1,16. Das bedeutet, daß ^{18}O sowohl in ^{14}N -Nitrit (aus GSNO_2) als auch in ^{15}N -Nitrit (aus GS^{15}NO) inkorporiert wurde. In das Nitrit aus GSNO_2 wurde allerdings deutlich weniger ^{18}O inkorporiert als in ^{15}N -Nitrit aus GS^{15}NO . Es kann somit auf diese Weise zwischen GSNO und GSNO_2 mittels GC-MS unterschieden werden.

6 Diskussion

6.1 Neu- und weiterentwickelte Methoden

Die Forschung auf dem NO-Gebiet gestaltet sich aus vielfältigen Gründen als sehr schwierig. NO selbst und viele seiner Metabolite wie S-Nitroso-Substanzen und Peroxynitrit sind in biologischen Flüssigkeiten sehr instabil, kommen in sehr niedrigen Konzentrationen vor und können nicht selten ineinander überführt werden. Die akkurate und Interferenz-freie Quantifizierung von NO, Nitrit, Nitrat, S-Nitroso-Substanzen und anderen Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten *in vitro* und insbesondere *in vivo* ist eine unabdingbare Voraussetzung für die zuverlässige Erforschung der Chemie, Biochemie und Pharmakologie von NO und seiner Metabolite und für die Ermittlung der Rollen von NO im menschlichen Organismus.

Die Erforschung von NO stellt daher eine sehr große Herausforderung für die analytische Chemie dar. Aus diesem Grunde überrascht es nicht, daß in den letzten Jahren mehrere Arbeitsgruppen zahlreiche analytische Verfahren zur quantitativen Erfassung von NO und seinen Metaboliten einschließlich der S-Nitroso-Substanzen entwickelt haben [64,149]. Unter diesen lassen nur auf der Massenspektrometrie beruhende Methoden eine eindeutige Identifizierung und eine akkurate Quantifizierung auch in komplexen biologischen Flüssigkeiten wie Plasma oder Urin zu. Da häufig, wie in der GC-MS, eine vorgeschaltete Derivatisierung notwendig ist, sind massenspektrometrische Verfahren nicht unbedingt uneingeschränkt einsetzbar, sondern erfordern eine vorherige Abtrennung der Analyten mit anderen chromatographischen Verfahren. Für die Realisierung der Ziele der vorliegenden Arbeit wurde aus den dargelegten Gründen die Massenspektrometrie als Hauptmeßverfahren gewählt. Bereits bestehende Verfahren wurden weiterentwickelt und validiert. Es wurden auch neue Methoden entwickelt und validiert. Diese werden im Folgenden diskutiert und mit Literatur-Methoden für die einzelnen Substanzen verglichen.

6.1.1 Analyse von SNALB mittels GC-MS

Die Bestimmung von endogenem SNALB in Humanplasma wurde bislang nur von einer einzigen Arbeitsgruppe unter Verwendung der Chemilumineszenz vorgenommen. Mit dieser Technik wurde die SNALB-Konzentration im Plasma von fünf gesunden Menschen als $7 \pm 5 \mu\text{M}$ bestimmt [6]. Diese Methode wurde allerdings nicht im Detail beschrieben. Kürzlich berichtete dieselbe Arbeitsgruppe, daß die Plasma-Konzentration von SNALB nur $0,25\text{-}1 \mu\text{M}$

beträgt [64] und somit wesentlich kleiner als die zuerst berichtete ist [6]. Diese Daten wurden mit derselben Methode gemessen. Die wesentlich niedrigeren Konzentrationen wurden auf das höhere Alter der Proben zurückgeführt. In einem wesentlich größeren Kollektiv von gesunden und erkrankten Personen wurden in der vorliegenden Arbeit Plasma-SNALB-Konzentrationen in der Größenordnung von 0,2 μM gemessen. Sie liegen somit im unteren Bereich der von Stamler *et al.* berichteten Konzentrationen für Plasma-SNALB. Bei der Chemilumineszenz-Methode erfolgt die SNALB-Bestimmung durch direkte Injektion von nativem Plasma in die Photolyse-Zelle, die zur NO-Freisetzung aus SNALB dient [6]. Das Fehlen von Interferenzen in dieser Methode wurde durch Vergleichsmessungen (Blindproben) von mit HgCl_2 vorbehandeltem Plasma zur Entfernung von endogenen S-Nitroso-Substanzen demonstriert. Eingehendere Untersuchungen zu möglichen Interferenzen, zur Genauigkeit und zum Detektionslimit dieser Methode sind bislang nicht publiziert worden. Daher können Interferenzen oder andere systematische Fehler bei der Quantifizierung von Plasma-SNALB mit dieser Methode nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

SNALB und niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen können auch spektrophotometrisch gemessen werden. Diese Methode wurde von anderen Arbeitsgruppen ausschließlich zur Untersuchung von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zwischen zwei S-Nitroso-Substanzen und ihren korrespondierenden Thiolen eingesetzt. Da die Extinktionsänderung um 340 nm bzw. 540 nm gemessen wird, kann die Spektrophotometrie nicht zur Bestimmung absoluter Konzentrationen in komplexen Medien angewandt werden. Da die UV-Vis-Spektren von Albumin und SNALB nahezu identisch sind, Albumin jedoch in einem sehr hohen Überschuss über SNALB vorliegt, kann SNALB nicht neben Albumin spektrophotometrisch bestimmt werden.

Die Massenspektrometrie stellt eine Alternative zur Chemilumineszenz und der Spektrophotometrie dar. In Gegenwart eines sehr großen Überschusses von Albumin gegenüber SNALB im Plasma – nach der vorliegenden Arbeit ca. 3800-fach – ist eine direkte Unterscheidung zwischen intaktem Albumin und intaktem SNALB mittels Massenspektrometrie schwierig oder gar unmöglich. Zum einen unterscheiden sich ihre Molekül-Massen nur geringfügig (um 29 Da, bei einer Molekülmasse von 68000 Da). Zum anderen können SNALB und Albumin nicht chromatographisch voneinander getrennt werden. Die Bestimmung von SNALB neben Albumin mittels HPLC ist nicht möglich aufgrund der Coelution dieser Substanzen [43]. Die Kopplung der Massenspektrometrie mit der HPLC scheidet aus diesem Grunde als eine Technik zur direkten Quantifizierung von SNALB aus. Um dennoch die Massenspektrometrie zur

Detektion von SNALB einsetzen zu können, wurde eine indirekte Methode entwickelt [59]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode weiterentwickelt, validiert und zur Quantifizierung von SNALB im Human-Plasma eingesetzt.

Für alle Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen sind gut charakterisierte Standards zur Kalibrierung bzw. zur Verwendung als interne Standards erforderlich. Während die Synthese niedermolekularer S-Nitroso-Substanzen schnell und einfach ist [16,30,43,150,151], gestaltet sich die Synthese von SNALB und S¹⁵NALB als ungleich schwieriger. Bei den zwei am häufigsten verwendeten Methoden zur Präparation von SNALB wird Albumin mit salpetriger Säure bei pH 2 oder mit Butylnitrit bei neutralem pH-Wert umgesetzt [19] (Abb. 64). Dabei kann die S-Nitrosylierung der Thiol-Gruppe des einzigen reduzierten Cysteins (Cys-34) am Albumin mit Reaktionen an zahlreichen anderen (aromatischen) Zentren des Proteins konkurrieren. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden angewendet und miteinander verglichen.

Die Untersuchungen der Reaktion von Plasma-Albumin mit salpetriger Säure bzw. Butylnitrit mittels UV-Vis-Spektrophotometrie haben klar gezeigt, daß bei der Verwendung von Butylnitrit offenbar kaum andere Zentren außer dem Cys-34 von Albumin nitros(yl)iert werden. Dafür spricht das Ausbleiben der Entwicklung eines Absorptions-Maximums bei 340 nm bei der Verwendung von Butylnitrit. Dieser Befund läßt sich mit der geringeren Elektrophilie von Butylnitrit gegenüber salpetriger Säure und damit einer geringeren Reaktivität mit aromatischen Gruppen von Albumin erklären. Neben der höheren Selektivität der S-Nitrosylierung von Cys-34 können auch höhere Ausbeuten erreicht werden. Das liegt u.a. daran, daß die Neutralisierung von SNALB-Ansätzen mit salpetriger Säure grundsätzlich zu einer teilweisen Denaturierung der Proteine führt. Die Verwendung von Butylnitrit ist wegen der schonenden Reaktions-Bedingungen (neutraler pH-Wert) und der höheren Selektivität die Methode der Wahl.

Die Synthese von SNALB-Standards durch S-Transnitrosylierung mit niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen wie SNC oder GSNO ist möglich, erfordert aber einen hohen molaren Überschuß an SNC bzw. GSNO [31,142]. Besonders das durch die S-Transnitrosylierungs-Reaktion von Albumin mit SNC gebildete Cystein muß im Anschluß an diese Reaktion aber vollständig entfernt werden. Andernfalls ist eine schnelle Zersetzung des SNALB-Standards über die intermediäre Bildung von instabilem SNC als Folge der Reversibilität von

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zu erwarten. Auch durch Nitrosylierung mit NO-Gas kann SNALB hergestellt werden. Die Ausbeuten sind allerdings niedrig, da NO das freie Cys-34 des Albumins in erheblichem Maße zur Sulfensäure oxidieren kann (Abb. 64) [152]. Darüberhinaus sind weitere Reaktionen von NO, z.B. mit aromatischen Bestandteilen von Albumin, möglich.

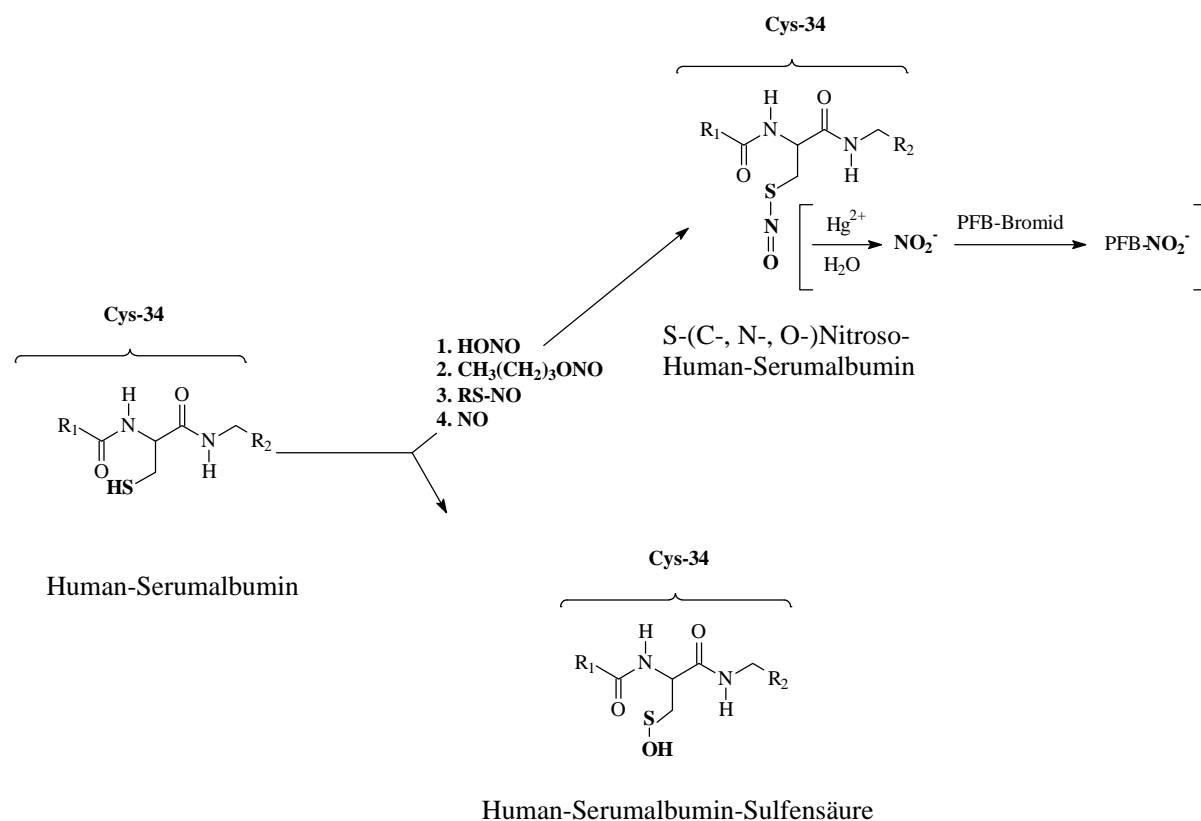


Abb. 64. Schematische Darstellung der angenommenen Reaktionen von Human-Serumalbumin (HSA) mit salpetriger Säure (HONO), Butylnitrit, S-Nitroso-Substanzen (RSNO) und NO. Salpetrige Säure, Butylnitrit, S-Nitroso-Substanzen (RSNO) und NO reagieren mit der Sulfhydryl-Gruppe des Cys-34 am HSA zu SNALB. Diese Reagenzien reagieren auch mit anderen Gruppen am HSA (als R_1 und R_2 gekennzeichnet) als mit Cys-34, wobei C-, N- und O-Nitroso-HSA gebildet werden kann. NO reagiert mit Cys-34 am HSA zusätzlich noch zur Sulfensäure [152]. Die Hg^{2+} -katalysierte Konversion von SNALB zu Nitrit und seine anschließende Derivatisierung mit PFB-Bromid zum PFB- NO_2^- für die GC-MS-Analyse ist in eckigen Klammern dargestellt.

Zur Herstellung von SNALB kann von kommerziell erhältlichem HSA ausgegangen werden. Solche Präparate enthalten jedoch nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz Cys-34 in reduzierter Form [43]. Vor der S-Nitrosylierung ist daher eine Reduktion notwendig. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Reduktion von bovinem Serum Albumin (BSA) mit Dithiotreitol (DTT) vor der Nitrosylierung zu einer extensiven molekularen Heterogenität über Oligomerisation führt [153]. Auch bei der Verwendung von NaBH_4 oder 2-Mercaptoethanol sind solche

Veränderungen möglich. Darüberhinaus haben sich Reduktions-Versuche mit diesen Substanzen als zeitaufwendig und bezüglich der Ausbeuten und Stabilitäten der Präparate als völlig ungeeignet erwiesen [59].

Aus diesen Gründen wurde zur Darstellung von SNALB-Standards in dieser Arbeit frisches Human-Plasma verwendet. Die SNALB-Standards können aus den Reaktions-Ansätzen leicht und in hoher Reinheit durch Extraktion mit HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen erhalten werden. Das gleiche Extraktionsverfahren wurde auch für die Quantifizierung von SNALB im Plasma und in Pufferlösungen mittels GC-MS angewandt. Dadurch wird auch eine komplette Entfernung von endogenem Nitrit und endogenen niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen erreicht, welche bei der anschließenden GC-MS-Analyse mit SNALB interferieren würden. Aufgrund des hohen Überschusses von Albumin gegenüber den niedermolekularen Thiolen Cystein (ca. 10 μM) und GSH (ca. 5 μM) im Plasma und den ermittelten Gleichgewichtskonstanten der Transnitrosylierungs-Reaktionen $\text{SNALB} + \text{Cys} \rightleftharpoons \text{ALB} + \text{SNC}$ und $\text{SNALB} + \text{GSH} \rightleftharpoons \text{ALB} + \text{GSNO}$ ($K_{\text{eq}} = 0,75$ bzw. 0,59) sind allerdings, zumindest unter physiologischen Bedingungen, keine im Vergleich zu SNALB (ca. 200 nM) nennenswerten Konzentrationen an SNC oder GSNO im Plasma und somit keine Interferenz durch diese Substanzen zu erwarten. Auch bei höheren SNC- und GSNO-Konzentrationen kann eine Interferenz seitens dieser Verbindungen eliminiert werden, indem ein größeres Volumen des Puffers A zur vollständigen Elution dieser an Blue Sepharose schwach bindenden S-Nitroso-Substanzen verwendet wird.

Bei der Verwendung von 1-ml-HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen zur Extraktion von SNALB und Albumin aus Plasma (400 μl) betrug die Wiederfindungs-Rate sowohl für SNALB als auch für Albumin 45 %. Trotz des nach den Ergebnissen dieser Arbeit etwa 3800-fachen Überschusses von Albumin gegenüber SNALB im Human-Plasma konnte keine Interferenz bei der Messung von SNALB mit dieser Methode festgestellt werden. S-Nitroso-Hämoglobin könnte mit der Messung von SNALB interferieren, da Hämoglobin von HiTrapBlue Sepharose-Kartuschen mit der Albumin/SNALB-Fraktion coeluiert. S-Nitroso-Hämoglobin, das physiologisch im Blut vorkommt [102], würde in Gegenwart von HgCl_2 ebenfalls Nitrit bilden. Diese mögliche Interferenz lässt sich leicht durch Verwendung von nicht-hämolytischem Plasma vermeiden.

Die wichtigste interferierende Spezies bei der GC-MS-Bestimmung von SNALB ist das ubiquitär, auch im Elutionspuffer (Puffer B) vorhandene Nitrit, das zum Peakflächenverhältnis m/z 46 zu m/z 47 aus SNALB-Analysen erheblich beiträgt.

Bei der Extraktion von SNALB aus Plasma (400 μ l) beträgt die SNALB-Konzentration im Eluat (2 ml) nur ein Zehntel seiner Plasma-Konzentration. Der Beitrag von Nitrit zum GC-MS-Peak mit m/z 46 ist deutlich größer (Faktor 12,5) als der von SNALB, wenn man von einer mittleren SNALB-Plasma-Konzentration von 200 nM und einer Nitrit-Konzentration im Elutionspuffer von 250 nM ausgeht. Eine Aufkonzentrierung der SNALB-Fraktion durch Ultrafiltration ist nützlich, da dabei der Beitrag von SNALB zu m/z 46 im Vergleich zu Nitrit, das hierbei nicht aufkonzentriert wird, steigt. Aufgrund der Interferenz durch Nitrit kann die SNALB-Plasma-Konzentration nicht einfach durch Multiplikation des Peakflächenverhältnisses von m/z 46 zu m/z 47 mit der Konzentration des internen Standards (d.h. S^{15} NALB) berechnet werden. Für die korrekte Berechnung wurde eine Formel entwickelt und deren Validität überprüft. Auch das LOQ der Methode wird durch Nitrit maßgeblich beeinflusst. Anhand von Untersuchungen mit S^{15} NALB konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode SNALB noch in einer Konzentration von unter 1 nM gemessen werden könnte, wenn in den Proben kein Nitrit aus anderen Quellen als SNALB vorhanden wäre.

Um das LOQ der Methode weiter zu verringern, wurde versucht, das Nitrit durch Ammoniumsulfamat [154] aus den Eluaten vor der Versetzung von SNALB mit $HgCl_2$ zu entfernen. Diese Vorgehensweise brachte jedoch keinen nennenswerten Erfolg, da die Eliminierung von Nitrit und des in großem Überschuß verwendeten Ammoniumsulfamats unvollständig waren. Darüberhinaus war anschließend eine Neutralisation notwendig, wodurch wiederum Nitrit in die Probe eingebracht wurde.

Der Zeitpunkt der Zugabe des internen Standards S^{15} NALB zum Plasma ist nicht entscheidend für die akkurate Bestimmung von SNALB mittels GC-MS. Das ist im Einklang mit der von unserer Arbeitsgruppe ermittelten Halbwertszeit von SNALB in Blut *in vitro* von 5,5 h [60]. Auch das verwendete Anticoagulant bei der Blutentnahme hat keinen signifikanten Einfluß auf die gemessene SNALB-Konzentration. Cystein und GSH weisen in EDTA-Plasma eine deutlich höhere Stabilität auf als in Citrat-Plasma, da sie in Abwesenheit von Chelatoren schnell und quantitativ oxidiert werden [44,96]. Kürzlich wurde berichtet, daß SNALB in frischem Plasma in höheren Konzentrationen vorliegt als in für 2-3 Wochen gelagertem Plasma

[64]. In unseren Untersuchungen wurde der interne Standard (S^{15} NALB) entweder sofort oder spätestens kurz vor dem ersten Auftauen zugesetzt. Da sich mit einem möglichen Zerfall des endogenen SNALB auch die Konzentration des internen Standards entsprechend ändert, ist die GC-MS-Methode weniger anfällig auf einen Zerfall von SNALB als andere Methoden, bei denen kein interner Standard verwendet wird.

Bei gesunden Freiwilligen und Patienten mit verschiedenen Leberkrankheiten bzw. chronischem Nierenversagen wurde mit der GC-MS-Methode SNALB im Plasma in Konzentrationen um 200 nM gemessen. In nur drei Plasma-Proben (von Leberkranken) von insgesamt 69 konnten höhere SNALB-Konzentrationen gemessen werden (zweimal 1000, einmal 2000 nM). Bei den Patienten mit Leberkrankheiten bestand eine Korrelation zwischen Erkrankung bzw. Krankheits-Aktivität und Plasma-Nitrat (nicht publizierte Beobachtung), aber nicht zwischen Krankheits-Aktivität und Plasma-SNALB. Die durchschnittliche Konzentration von SNALB im Plasma von gesunden Menschen ist damit nach unserer Methode um eine Größenordnung kleiner als die von Stamler *et al.* gemessenen SNALB-Konzentrationen [6].

Daß SNALB im Plasma von gesunden Menschen physiologisch vorkommt, wurde auch mit einem Bioassay bestätigt. Die Plättchenaggregations-Messungen haben ferner darauf hingedeutet, daß die SNALB-Konzentration im Plasma nicht in der Größenordnung von 7 μ M, sondern sehr viel kleiner ist. Auch die aus SNALB durch S-Transnitrosylierung gebildete SNAC-Konzentration bestätigte die mittels GC-MS gemessenen SNALB-Konzentrationen [59]. Daten über das Vorkommen und die Konzentrationen von SNALB in Human-Plasma von anderen Arbeitsgruppen sind bisher nicht bekannt. Es wurde lediglich berichtet, daß die Gesamt-Konzentration von S-Nitroso-Substanzen im Plasma unter 2 μ M beträgt [155].

Obwohl die bei gesunden Menschen vorkommende physiologische SNALB-Konzentration nicht in der Größenordnung von 7 μ M liegt, wie von Stamler *et al.* berichtet [6], sondern nur ca. 200 nM beträgt, heißt das nicht, daß eine solche Konzentration keinen relevanten biologischen Effekt haben könnte. So wurde durch Plättchenaggregationsmessungen gezeigt, daß auch derart niedrige Konzentrationen zu einer geringfügigen Inhibition der Aggregation führen können. Eine Konzentration von 7 μ M würde hingegen zu einer kompletten Inhibition führen. Das wäre für einen lebenden Organismus von großem Nachteil, z.B. bei äußeren und inneren Verletzungen, da durch die komplette Inhibition der Plättchenaggregation die Blutverluste erhöht wären. Das physiologische Vorkommen von SNALB im Plasma von Menschen

bedeutet, daß durch S-Transnitrosylierungs-Reaktionen mit Plasma-Cystein und Plasma-GSH auch die niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO physiologisch im Plasma von Menschen vorkommen, wenn auch nur in Konzentrationen im untersten nM-Bereich (s.u.). SNALB ist der häufigste und langlebigste NO-Träger in der Zirkulation des Menschen. Die Hypothese von Stamler *et al.*, daß *in vivo* ein Transfer von NO-Äquivalenten zwischen Plasma-Proteinen wie Albumin und niedermolekularen Plasma-Thiolen wie Cystein und GSH stattfindet, wobei die Plasma-Proteine als Speicher und die niedermolekularen Thiole als Vermittler der biologischen Aktivität dienen [7], ist weiterhin plausibel.

6.1.2 Analyse von GSNO und SNC mittels GC-MS

Für die physiologischen niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO wurde eine Methode zur akkuraten und empfindlichen Bestimmung mittels GC-MS entwickelt. Auch in dieser Methode liegt die quantitative und selektive Umwandlung der S-Nitroso-Gruppen zu Nitrit mittels Hg^{2+} und dessen Quantifizierung als PFB- NO_2 mittels GC-MS zugrunde. Es werden hier ebenfalls die ^{15}N -markierten Analoga der S-Nitroso-Substanzen als authentische interne Standards verwendet. Diese Methode konnte in unterschiedlichen Matrices erfolgreich eingesetzt werden. In Erythrozyten, die mit SNC inkubiert wurden, entstanden neben GSNO nur sehr niedrige Nitrit- und SNC-Konzentrationen, so daß GSNO im Erythrozyten-Cytosol direkt mit dieser Methode quantifiziert werden konnte. Für die Quantifizierung von SNC und GSNO im Plasma, in dem Nitrit und zahlreiche hoch- und niedermolekulare S-Nitroso-Substanzen vorkommen [6,61,64], ist allerdings eine vorgeschaltete chromatographische Isolierung der zu quantifizierenden S-Nitroso-Substanz unbedingt erforderlich.

Die Abtrennung von SNC und GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten mittels HPLC ist eine geeignete Möglichkeit, um diese Substanzen selektiv mittels GC-MS zu quantifizieren. Es muß allerdings eingeräumt werden, daß endogene Konzentrationen von SNC und GSNO im Plasma mit dieser Methode nicht bestimmt werden können. Das liegt daran, daß S-Nitroso-Substanzen in Plasma, Ultrafiltrat oder im HPLC-Eluenten viele Reaktionen wie Zersetzung zu NO oder S-Nitrosylierungen [16,64,144] eingehen können. Daher sind die tatsächlichen Konzentrationen von S^{15}NC und GS^{15}NO in den gesammelten HPLC-Fractionen, die aus Analysen von Plasma-Ultrafiltraten stammten, nicht bekannt. Bei den entsprechenden Untersuchungen war Nitrit im HPLC-Eluenten in einer Konzentration von $1,774 \pm 0,163 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SD, $n = 10$) vorhanden. Unter der Annahme, daß die S^{15}NC - und GS^{15}NO -Konzentra-

tionen nach ihrer Zugabe zum Plasma-Ultrafiltrat unverändert blieben, ermitteln sich die Konzentrationen der Summe von Nitrit und RSNO in den HPLC-Fractionen von SNC und GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten, denen kein SNC oder GSNO extern zugesetzt wurde, zu 1,767 bzw. 1,998 μM . Diese Werte sind in der Größenordnung des Blank-Nitrits, das im HPLC-Eluenten vorhanden ist. Aus diesem Grunde kann angenommen werden, daß die endogenen SNC- und GSNO-Konzentrationen im Plasma im unteren nM-Bereich liegen.

Eine akkurate Quantifizierung von GSNO und SNC mit dieser Methode könnte möglich sein, wenn Blank-Nitrit vor der Versetzung mit HgCl_2 quantitativ entfernt wird und bei der weiteren Aufarbeitung kein Nitrit eingeschleppt wird. Die Gefahr einer artifiziellen Bildung von S-Nitroso-Substanzen aus Nitrit und Thiolen unter den Reaktionsbedingungen der Nitrit-Entfernung mit Ammoniumsulfamat ist sehr hoch. Daher muß die HPLC-Fraktion der zu analysierenden S-Nitroso-Substanz frei von Thiolen sein. Das könnte gegebenenfalls durch die Verwendung von NEM bei einem neutralen pH-Wert erreicht werden.

Die Kombination von HPLC und GC-MS zur Bestimmung von SNC und GSNO hat sich vor allem bei dem Nachweis ihrer ^{15}N -markierten Analoga in biologischen Proben aus *in vivo*- und *in vitro*- Versuchen als hilfreich erwiesen. Die relativ niedrige natürliche Häufigkeit von ^{15}N (0,36%) und die GC-MS-Detektion der Ionen $^{15}\text{NO}_2^-$ und $^{14}\text{NO}_2^-$ ermöglichen Untersuchungen zur Chemie und Biochemie von S-Nitroso-Substanzen bei Verwendung extrem niedriger, physiologischer Konzentrationen um 1 nM. Bei Analysen mittels HPLC und UV-Detektion bei 340 nm sind Untersuchungen nur bei Konzentrationen der S-Nitroso-Substanzen über 1 μM möglich. Spektrophotometrische Untersuchungen erfordern sogar Konzentrationen um 10-100 μM . Bei diesen sehr hohen, unphysiologischen Konzentrationen zeigen S-Nitroso-Substanzen jedoch andere chemische Eigenschaften, die sich gänzlich von denen unterscheiden können, die sie im unteren nM-Bereich aufweisen, z.B. bezüglich der Metallionen-katalysierten NO-Freisetzung.

6.1.3 Analyse von GSNO als OPA-GSH-Derivat mittels HPLC

Auf der Basis der außergewöhnlichen Reaktion von GSH mit OPA, bei der ein sehr stabiles und hoch Fluoreszenz-aktives tricyklisches Isoindol-Derivat von GSH (Abb. 13, Mitte) [68] gebildet wird, konnte eine Methode zur selektiven Bestimmung von GSNO entwickelt werden. Sie ist frei von Interferenzen durch andere S-Nitroso-Substanzen und GSH in rele-

vanten Konzentrationen. Auch besteht bei dieser Methode keine Gefahr einer artifiziellen GSNO-Bildung aus GSH und Nitrit.

Das Prinzip der Methode basiert auf der Bildung von GSH aus GSNO durch S-Transnitrosylierung mit einem Überschuß an 2-Mercaptoethanol und der simultanen Reaktion des aus GSNO stammenden GSH mit OPA zur Bildung des OPA-GSH-Derivats. GSNO ist in biologischen Flüssigkeiten wie Plasma neben relativ hohen GSH- und GSSG-Konzentrationen nur in sehr niedrigen Konzentrationen zu erwarten [6,49,64,100]. Weder GSH und GSSG noch gemischte Disulfide von GSH im Plasma interferieren. Das komplette Entfernen von GSSG und wahrscheinlich auch der gemischten Disulfide, ferner teilweises Entfernen von GSH und die Isolierung von intaktem GSNO konnte durch HPLC-Analyse von derivatisierten Plasma-Ultrafiltrat-Proben erreicht werden. Die vollständige Abtrennung von GSSG und anderen gemischten Disulfiden von GSH war notwendig, da diese durch Reaktion mit 2-Mercaptoethanol zu GSH reduziert werden. Das verbleibende GSH in der HPLC-Fraktion von GSNO konnte vollständig durch den Einsatz von NEM entfernt werden. Die NEM-Konzentration wurde so optimiert, daß das aus GSNO gebildete GSH nicht betroffen wurde. Das restliche NEM kann mit dem aus GSNO freigesetzten GSH nicht reagieren, da es durch 2-Mercaptoethanol sehr schnell und vollständig S-alkyliert wird.

Die massenspektrometrischen Analysen zeigen eindeutig, daß das aus GSNO gebildete OPA-Derivat identisch mit dem OPA-GSH-Derivat ist, das Neuschwander-Tetri und Roll als tri-cyclisches Isoindol-Derivat von GSH charakterisiert haben [68]. Der Mechanismus der Bildung des OPA-GSH-Derivates nach der Inkubation von GSNO mit OPA-Reagenz B, d.h. in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol, konnte aufgeklärt werden. Dieser beinhaltet die Bildung von einem OPA-GSH- (OPA-GSH) und einem OPA-GSH-2-Mercaptoethanol-Derivat (OPA-GSH-2ME), welches schließlich durch langsame Cyklisierung in das stabilere OPA-GSH weiterreagiert (Abb. 13). Für diesen Mechanismus spricht auch die Bildung gemischter OPA-Isoindol-Derivate aus zahlreichen Aminosäuren und OPA in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol [156,157].

Die Anwendbarkeit dieser Methode *in vivo* wurde demonstriert. In eine Ratte i.v. infundiertes GSNO konnte im Plasma Interferenz-frei quantifiziert werden. Die Kombination von zwei HPLC-Analysen zur Isolierung von intaktem GSNO aus Plasma-Ultrafiltrat und der anschließenden HPLC-Analyse mit Fluoreszenz-Detektion erlaubt eine hochspezifische und

empfindliche Detektion von GSNO im Ultrafiltrat von Human- und Ratten-Plasma, bei der weder GSH noch GSSG interferieren. Auch Cystein, das im Plasma in Konzentrationen um 10 μM vorhanden ist [44,96], interferiert weder in der HPLC-Analyse von GSH [68] noch von GSNO in dieser Methode. SNALB wird durch die Plasma-Ultrafiltration komplett entfernt und kann so ebenso wenig interferieren. Der Nachteil dieser Methode bei der Bestimmung von GSNO im Plasma besteht darin, daß die Plasma-Proben um einen Faktor von etwa 10 verdünnt werden. Dadurch wird die Nachweisgrenze der Methode gegenüber der Analyse wäßriger Proben von 3 nM auf 100 nM heraufgesetzt. Die mittlere Wiederfindungsrate von GSNO aus Plasma-Ultrafiltraten beträgt ca. 90 %. Der geringe Verlust von 10 % kann auf eine langsame Zersetzung von GSNO und/oder die Reaktion mit niedermolekularen Thiolen im Ultrafiltrat erklärt werden. Der zweifelsfreie Nachweis der Existenz von endogenem GSNO in menschlichem Plasma konnte bislang nicht erbracht werden. Mit der HPLC-Analyse von GSNO als OPA-GSH-Derivat konnte GSNO in keiner der untersuchten Plasma-Proben von gesunden Probanden gefunden werden. Es kann daraus geschlossen werden, daß die endogene Konzentration von GSNO in Human-Plasma kleiner als 100 nM ist.

6.1.4 Bestimmung der Aktivität von isolierter neuronaler NO-Synthase mittels GC-MS

Die Methode basiert auf der Quantifizierung von Nitrit, dem Hauptprodukt der Oxidation von NO in wäßrigen Lösungen [35], mittels GC-MS. Aufgrund der Anwesenheit von Nitrit (260 nM) in den verwendeten Puffern und Reagenzien wurde als Substrat der NOS L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin verwendet, um zweifelsfrei die NOS-katalysierte Bildung auch kleinster Mengen von [^{15}N]Nitrit nachzuweisen und unter Verwendung von [^{14}N]Nitrit als internen Standard zu quantifizieren. Das LOQ der Methode beträgt 20 nM [^{15}N]Nitrit, wenn [^{14}N]Nitrit (2,5 μM) verwendet wird und sogar nur etwa 4 nM, wenn auf die Zugabe von [^{14}N]Nitrit verzichtet wird. In diesem Fall kann das aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin stammende [^{15}N]Nitrit über das in relativ konstanten Konzentrationen vorkommende Blank-Nitrit (260 nM) quantifiziert werden.

In Gegenwart optimierter Konzentrationen aller Cofaktoren der NOS wurde für die NOS-katalysierte Reaktion von L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin zu [^{15}N]Nitrit eine Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt. Der mit der vorliegenden Methode ermittelte K_{M} -Wert betrug 3,30 (nach Hanes) bzw. 3,01 μM (nach Lineweaver-Burk) für L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin. Die V_{max} -Werte betrugen 0,205 (nach Hanes) bzw. 0,207 μmol [^{15}N]Nitrit $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg NOS}^{-1}$ (nach Lineweaver-Burk). Die

hier ermittelten K_M -Werte wurden auch mittels Citrullin-Assay zur Bestimmung der NOS-Aktivität erhalten, während die ermittelten V_{\max} -Werte um etwa 1/3 kleiner sind [158,159,160,161,162]. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß die [^{15}N]Nitrit-Bildung in NOS-Ansätzen etwa 1/3 des von der NOS umgesetzten L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginins entspricht. Es konnte ferner gezeigt werden, daß in Abwesenheit von GSH die verbleibenden 2/3 des L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginins in NOS-Ansätzen zu [^{15}N]Nitrat oxidiert werden.

Diese Methode wurde exemplarisch zur Untersuchung verschiedener NOS-Inhibitoren angewendet. Die Experimente zeigten, daß L-NNA der stärkste getestete NOS-Inhibitor unter den getesteten (L-NNA > ADMA > L-NMA > L-NAME > SDMA) ist. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit publizierten Studien an neuronaler NOS [161,162]. Für ADMA wurde gezeigt, daß diese Substanz ein endogener Inhibitor der NOS in Makrophagen und in Gefäßen ist [120]. In eigenen Untersuchungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß ADMA ein potenter nicht-kompetitiver Inhibitor der neuronalen NOS ist ($K_i = 0,42$ nach Hanes bzw. $0,32 \mu\text{M}$ nach Lineweaver-Burk, $K_{ii} = 1,62$ bzw. $2,18 \mu\text{M}$ für ADMA).

Die Simulation der NOS-Aktivität mit den experimentell gewonnenen Daten gelang mit einem Modell für nicht-kompetitive Hemmung durch ADMA wesentlich besser als mit einem Modell für kompetitive Hemmung. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß ADMA die isolierte neuronale NOS erheblich stärker hemmt als sein Isomer SDMA. In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, daß die intravenöse Infusion von L-Arginin bei Menschen zu einer NO-abhängigen Vasodilatation *in vivo* und gesteigerten Nitrat- und cGMP-Ausscheidungen in den Urin führte [163], obwohl die NOS bei einer endogenen Plasma-Konzentration von L-Arginin (ca. $80 \mu\text{M}$, eigene unveröffentlichte Ergebnisse) die NOS mit dem Substrat L-Arginin gesättigt sein sollte. Dieses scheinbare Paradoxon kann durch die Existenz des endogenen Inhibitors ADMA erklärt werden. Die oben genannte Studie [163] führte jedoch zu dem Ergebnis, daß die intravenöse L-Arginin-Gabe nur eine leichte Erhöhung der NOS-Aktivität *in vivo* verursachte. Eine Erhöhung der L-Arginin-Konzentration im Plasma um einen Faktor von 10 sollte bei einer Inhibitionskonstanten K_i von ADMA von $0,42$ bzw. $0,32 \mu\text{M}$, der Annahme einer kompetitiven Inhibition durch ADMA und einer endogenen Konzentration von ADMA um $1 \mu\text{M}$ [120] zu einer ausgeprägteren Erhöhung der NOS-Aktivität führen. Legt man zugrunde, daß ADMA ein nicht-kompetitiver Inhibitor mit

einem K_{ii} -Wert von 1,62 bzw. 2,18 μM ist, so ist die beobachtete relativ geringfügige Steigerung der NOS-Aktivität *in vivo* hingegen erklärbar.

Kürzlich wurde eine negative Korrelation zwischen Plasma-ADMA-Konzentration und Urin-Nitrat-Konzentration bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankung [122] und essentiellem Bluthochdruck [120] gefunden. Die Akkumulation von ADMA im Plasma wird als ein Risiko-Faktor für die Entwicklung von NO-abhängiger endothelialer Dysfunktion und von Herz-Kreislauf-Erkrankungen diskutiert [120,122]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bekräftigen diese Vermutung und zeigen, daß selbst die Konzentrationen bei gesunden Probanden ausreichen, um eine partielle Hemmung zu bewirken.

In eigenen Untersuchungen wurde eine schwache Inhibition der NOS durch L-NAME festgestellt. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, daß die durch L-NAME hervorgerufene Inhibition auf die Bildung der freien Säure L-NNA durch deren Bioaktivierung [164] oder durch spontane Hydrolyse [162] zurückgeht. Die HPLC-Analyse von frisch hergestellten Lösungen von L-NAME zeigte, daß L-NNA in diesen Lösungen tatsächlich zu etwa 15 % anwesend war. Die in den hiesigen Untersuchungen gemessene schwache Hemmung der NOS durch L-NAME ist daher höchst wahrscheinlich auf L-NNA und nicht auf L-NAME selbst zurückzuführen.

Für die Bestimmung der Aktivität von NOS existiert eine Reihe von Methoden. Sie alle basieren auf der Messung der NOS-Produkte NO und Citrullin. Im letzteren Fall wird dabei radioaktiv markiertes L-Arginin als Substrat eingesetzt und radioaktives L-Citrullin gemessen. Diese Methode ist zwar einfach in der Durchführung, beschränkt sich aber auf isolierte NOS-Präparationen, da L-Arginin zu über 99 % im Harnstoffzyklus zu L-Citrullin metabolisiert wird [165]. Wegen der unzuverlässigen direkten Messung von NO in NOS-Ansätzen wird vorzugsweise Nitrit, sein alleiniges Oxidationsprodukt in wässrigen Lösungen [35], bestimmt. Unter den Methoden für die Nitrit-Bestimmung bietet die GC-MS-Methode eine Reihe von gewichtigen Vorteilen. Der wichtigste Vorteil ist ihre uneingeschränkte Anwendbarkeit in Bezug auf die zu untersuchende Matrix. Ferner erlaubt die GC-MS die Erfassung von weiteren potentiellen NO-Metaboliten wie Nitrat und GSNO. Damit erhält man wichtige Informationen über die Bildung biologisch aktiver Metabolite, die man mit dem Citrullin-Assay nicht gewinnen kann.

6.2 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen

6.2.1 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in gepufferten wäßrigen Lösungen

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen waren Gegenstand von Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen [16,30,31,32,144,166]. Die analytische Basis für diese Untersuchungen bildete die Spektrophotometrie. In der vorliegenden Arbeit wurden S-Transnitrosylierungs-Reaktionen von verschiedenen S-Nitroso-Substanzen und ihren korrespondierenden Thiolen mittels HPLC und GC-MS untersucht. Die Vorteile dieser Techniken sind die uneingeschränkte Anwendbarkeit in biologischen Flüssigkeiten, bei Mehrkomponenten-Systemen und bei annähernd physiologischen Konzentrationen der untersuchten S-Nitroso-Substanzen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden die Gleichgewichtskonstanten von 11 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen ermittelt, davon sechs im Rahmen dieser Arbeit. Ferner wurden S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in ternären und quartenären wäßrigen Gemischen, in Plasma, Blut, Erythrozyten und *in vivo* an der Ratte untersucht.

S-Transnitrosylierungen sind sehr schnelle Reaktionen [30,48]. Bereits nach 1 min war beispielsweise das Gleichgewicht in einem Reaktionsgemisch aus 500 μM Cystein und 100 μM GSNO hergestellt [142]. Die Reaktions-Geschwindigkeitskonstanten k_2 für die S-Transnitrosylierungs-Reaktion $\text{GSH} + \text{SNC} \rightleftharpoons \text{GSNO} + \text{Cys}$ hat einen Wert von über $70 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ [142]. Meyer *et al.* [30] haben für diese Reaktion einen vergleichbaren Wert erhalten.

Mit Ausnahme der Reaktion $\text{Cys} + \text{SNAP} \rightleftharpoons \text{SNC} + \text{NAP}$ (Reaktion 6, Tab. 4) waren alle untersuchten Gleichgewichte stabil. In Reaktion 1 wurde eine langsame Bildung von Nitrit beobachtet. Diese ist eher auf die Zersetzung von SNC als von GSNO zurückzuführen, da SNC wesentlich instabiler als GSNO ist. Es zeigte sich, daß SNC im Gemisch mit Thiolen (Reaktion 1; 120 min) generell eine deutlich verlängerte Halbwertszeit hat als allein (7 min) [142]. Die Halbwertszeit ist allerdings im Gemisch von NAP und Cystein erheblich kleiner (20 min), obwohl SNAP in Abwesenheit von anderen Thiolen eine stabile S-Nitroso-Substanz ist (Halbwertszeit: 5,5 h, [142]). Auch in anderen S-Transnitrosylierungs-Reaktionen, an denen NAC oder Cystein beteiligt waren, stellten sich stabile Gleichgewichte ein. Daher ist es besonders überraschend, daß SNAP in Reaktion 6 sogar instabiler als SNC war (Halbwertszeit: 4 min). Eine Erklärung könnte sein, daß NAP nicht in der Lage ist, mit Cu^{2+} -Ionen Thiolate zu bilden. In der Tat zeigte sich, daß die Zugabe von SNC (20 μM) zu NAP (500 μM) in Tris-

Puffer zu einer merklichen NO-Freisetzung führte, die bei der Zugabe von SNC zu Cystein oder bei allen anderen S-Transnitrosylierungs-Reaktionen nicht beobachtet werden konnte. Der nach 1 min Inkubation gemessene Wert der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} für Reaktion 6 (Tab. 4), betrug 2,98 und stimmt gut mit dem von Meyer *et al.* [30] gemessenen Wert von 2,38 überein.

Im quartenären Gemisch von SNC, SNAP, GSNO, SNAC und ihren Thiolen waren SNC und SNAP nach kurzer Zeit nicht mehr zu messen, während sich SNAC und GSNO wie in ihrem binären Gemisch verhielten. Das ist darauf zurückzuführen, daß sowohl SNC als auch SNAP gute NO^+ -Donoren und NAC und GSH gute NO^+ -Akzeptoren sind. So lagen SNC und SNAP, die unter diesen Bedingungen instabil sind, bereits nach kurzer Reaktionszeit in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Die vergleichsweise geringe Stabilität von GSNO und SNAC in diesem quartenären Gemisch ist vermutlich auf die intermediäre Bildung von kleinen Konzentrationen von SNC und SNAP durch S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit Cystein bzw. NAP zurückzuführen.

Bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen konnte mit Ausnahme von Reaktion 6 (Tab. 4) keine Bildung von NO gemessen werden. S-Transnitrosylierungs-Reaktionen verlaufen deutlich schneller als die NO-Freisetzung aus den untersuchten S-Nitroso-Substanzen, selbst aus dem relativ starken NO-Donor SNC. In Reaktionsgemischen von SNC, GSNO und ihren Thiolen konnten nur sehr niedrige Konzentrationen der oxidierten Thiole Cystin und GSSG gemessen werden. Ihre Bildung ist nicht auf die S-Transnitrosylierungs-Reaktion, sondern eher auf die Autooxidation von Cystein und GSH zurückzuführen. Experimente mit [^{14}C]-markiertem SNC bzw. Cystein haben bestätigt, daß das Hauptprodukt der Reaktion einer S-Nitroso-Substanz mit einem anderen Thiol das korrespondierende Thiol der S-Nitroso-Substanz ist. Zusammen mit der Feststellung, daß kein NO bei solchen Reaktionen gebildet wurde, ist der Rückschluß erlaubt, daß S-Transnitrosylierungen nicht über einen radikalischen Mechanismus, also eine Freisetzung von NO, ablaufen. Es wurde allerdings nicht untersucht, ob gemischte Disulfide entstanden sind. Es ist jedoch zu vermuten, daß das nicht der Fall ist, da dies wiederum einen radikalischen Mechanismus nahelegen würde, bei dem gleichzeitig auch GSSG und Cystin hätten entstehen müssen. Andere oxidierte Formen der Thiole wie GSOH oder CysOH wurden auch nicht gemessen.

Es konnte bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen kein NH_2OH gemessen werden. Das bedeutet, daß bei diesen Reaktionen ebenfalls kein NO^- intermediär gebildet wurde. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Arnelle *et al.* [16], die bei der Inkubation von GSNO mit einem zehnfachen molaren Überschuß an GSH ebenfalls kein Hydroxylamin messen konnten. Diese Arbeitsgruppe hat beobachtet, daß Hydroxylamin und Disulfide ausschließlich bei der S-Transnitrosylierungs-Reaktion von GSNO bzw. SNC mit dem vicinalen Thiol DTT entstehen [16]. Die Entstehung von NO^- und NH_2OH wurde dabei auf die Freisetzung von NO^- aus S-Nitroso-DTT und die Weiterreaktion von NO^- mit Thiolen zu NH_2OH zurückgeführt. Wong *et al.* [144] haben dagegen herausgefunden, daß bei der Reaktion von GSNO mit GSH zahlreiche Produkte wie GSSG, NO^- , NO, N_2O , NH_2OH , Sulfinamide und Ammoniak entstehen können. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen 1-10 mM GSNO und 5-100 mM GSH verwendet. Diese extremen Reaktionsbedingungen sind somit unter höchst unphysiologischen Bedingungen durchgeführt worden. Zusätzlich betrugen die Inkubationszeiten 24 h, was bedeutet, daß die Entstehung allein auf die Autooxidation von GSH zurückzuführen sein wird. Bei derart langen Inkubationszeiten ist ferner zu erwarten, daß sekundäre Reaktionen zu den gemessenen Produkten geführt haben. Selbst unter diesen Reaktionsbedingungen waren bei einem GSH- zu GSNO-Verhältnis von 10:1 N_2O (ein stabiles NO^- -Endprodukt), NO und NH_2OH in Gegenwart von Sauerstoff nur Nebenprodukte (unter 5 % in Bezug auf GSNO), während Nitrit das Hauptprodukt unter den entstandenen stickstoffhaltigen Verbindungen war.

Unter physiologischen Bedingungen ist das Verhältnis Thiole zu S-Nitroso-Substanzen erheblich größer als 10:1. Das Verhältnis von Albumin zu SNALB beträgt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit etwa 3800:1. Berücksichtigt man, daß die einzige freie Thiol-Gruppe am Albumin (Cys-34) in frisch gewonnenem Human-Plasma zu etwa 40 % in reduzierter Form vorliegt [43], beträgt das Verhältnis Albumin (mit reduziertem Cys-34) zu SNALB etwa 1500:1.

Die Inkubation von SNC in Gegenwart steigender Konzentrationen von Cystein über einen Zeitraum von 20 h bestätigte, daß Hydroxylamin in sehr niedrigen Konzentrationen gebildet werden kann. Es stellte sich ferner heraus, daß die Konzentration des stickstoffhaltigen Hauptproduktes Nitrit nach 20 h Inkubation mit steigender Cystein-Konzentration in solchen Ansätzen abnimmt. Das zeigt, daß Cystein das SNC nicht nur stabilisiert, sondern auch zu

einem veränderten Reaktionsmechanismus von SNC führen kann. Der Ausbeute-Verlust von Nitrit kann allerdings nicht auf die geringfügige Hydroxylamin-Bildung zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung für die Änderung des Mechanismus der Reaktion von SNC zu Nitrit in wäßrigen Lösungen und seine Stabilisierung in Gegenwart von Cystein könnte die Bildung von Cu(II)-Thiolaten sein. Diese Erklärung stimmt gut mit der Beobachtung überein, daß ein Zusatz von CuSO_4 zu SNC-Ansätzen in Puffer die Ausbeute von Nitrit erhöht sowie die NO-Freisetzung beschleunigt (siehe auch [59]). In Abwesenheit von Cu^{2+} -Ionen ist auch der Cu^{1+} -katalysierte Zerfallsmechanismus von SNC unterdrückt. Mechanismen wie photolytische Spaltung, thermische Zersetzung oder die Zersetzung durch andere Metallionen, die mit Cystein keine Thiolate bilden, könnten dadurch dominieren und zu anderen Produktsammensetzungen führen.

Eine weitere wichtige Beobachtung aus den Untersuchungen zum Kupfer- und Cystein-abhängigen SNC-Zerfall ist die, daß sich die NO-Freisetzung aus SNC selbst in Gegenwart von Cystein durch den Zusatz sehr niedriger CuSO_4 -Konzentrationen deutlich steigern läßt. Das spricht dafür, daß zwar ein großer Teil der extern zugesetzten Cu^{2+} -Ionen mit Cystein zum Thiolat reagiert, gleichzeitig aber wesentlich höhere Konzentrationen von Cu^{1+} -Ionen entstehen. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit Publikationen, die Cu^{1+} -Ionen als den eigentlich aktiven Katalysator einstufen und die Entstehung von Cu^{1+} -Ionen auf die Reduktion von Cu^{2+} -Ionen durch reduzierte Thiole postulieren [23,64].

Im Gegensatz zu SNC setzen alle anderen S-Nitroso-Substanzen, (auch SNhC) in pH-neutralen, gepufferten wäßrigen Lösungen keine nennenswerten NO-Mengen frei. Das extrem unterschiedliche Verhalten von SNC und SNhC in Bezug auf die NO-Freisetzung und Stabilität dieser sehr ähnlichen Substanzen in wäßrigen Lösungen verdeutlicht, auf welche dramatische Weise sich kleine Unterschiede in der molekularen Struktur auf die Stabilität und möglicherweise auch auf die biologische Aktivität von S-Nitroso-Substanzen auswirken können. Der ausgesprochen starke Effekt von Cu^{2+} -Ionen auf die Freisetzung von NO aus SNC, nicht aber aus SNhC, läßt vermuten, daß die Interaktion von Cu^{2+} -Ionen mit SNC sehr gut möglich, mit SNhC jedoch nicht möglich ist. Da der einzige Unterschied in der Struktur von SNC und SNhC eine CH_2 -Gruppe ist, könnte man davon ausgehen, daß in der Interaktion von Cu^{2+} -Ionen mit SNC sowohl die α -Amino-Gruppe als auch die S-Nitroso-Gruppe beteiligt sind (Abb. 65, links). Der Abstand zwischen diesen Gruppen ist in SNhC um die Länge der

CH_2 -Gruppe größer als in SNC. Aus diesem Grunde könnten die Cu^{2+} -Ionen nicht auf die gleiche Weise mit SNhC interagieren wie mit SNC (Abb. 65, Mitte). Möglicherweise sind die etwas größeren Cu^{1+} -Ionen besser befähigt, die Koordination mit der α -Amino-Gruppe und der S-Nitroso-Gruppe zu bewerkstelligen, womit eine Destabilisierung der S-Nitroso-Gruppe einhergehen würde. Dieser Mechanismus wird durch die Beobachtung unterstützt, daß eine N-Acetylierung der α -Amino-Gruppe von SNC zu SNAC eine drastische Erhöhung der Stabilität der S-Nitroso-Gruppe bewirkt (Abb. 65, rechts).

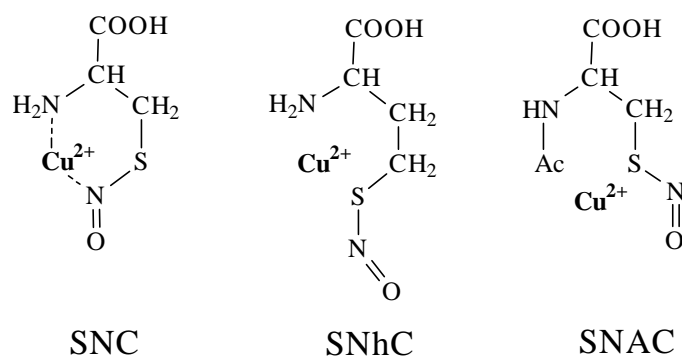


Abb. 65. Interaktion von SNC, SNhC und SNAC mit Cu^{2+} -Ionen. Lediglich SNC ist in der Lage, sowohl mit seiner α -Amino-Gruppe als auch der S-Nitroso-Gruppe mit dem Cu^{2+} -Ion zu interagieren und ist vermutlich dadurch wesentlich instabiler als SNhC und SNAC (s. auch Text).

Bei der Inkubation des NO-Donors SNP in Gegenwart der Thiole Cystein und GSH konnte keine Bildung der S-Nitroso-Substanzen beobachtet werden. Die Verwendung von ^{14}C -Cystein in einem solchen Experiment zeigte, daß nicht einmal kleinste SNC-Mengen bei der Reaktion von SNP mit Cystein entstehen. Vorangegangene *in vivo*-Studien [5] stellen einen Zusammenhang zwischen Thiol-Status und vasodilatatorischer Wirkung von SNP her. Es ist auch nach wie vor nicht auszuschließen, daß es *in vivo* zu einer Bildung von S-Nitroso-Substanzen aus SNP kommt, die direkt oder über NO-Freisetzung vasodilatatorisch wirken.

Unter Betrachtung der in dieser Arbeit bei der Untersuchung von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in gepufferten wäßrigen Lösungen erzielten Ergebnisse läßt sich für S-Transnitrosylierungs-Reaktionen der in Abb. 66 dargestellte Mechanismus postulieren. Er beinhaltet den nucleophilen Angriff eines Thiolat-Anions (R_1S^-) auf das Stickstoff-Atom einer S-Nitroso-Substanz (R_2SNO) und die heterolytische Spaltung ihrer S-N-Bindung, wobei die S-Nitroso-Substanz R_1SNO und das Thiolat R_2S^- entstehen. Diese Reaktion ist reversibel.

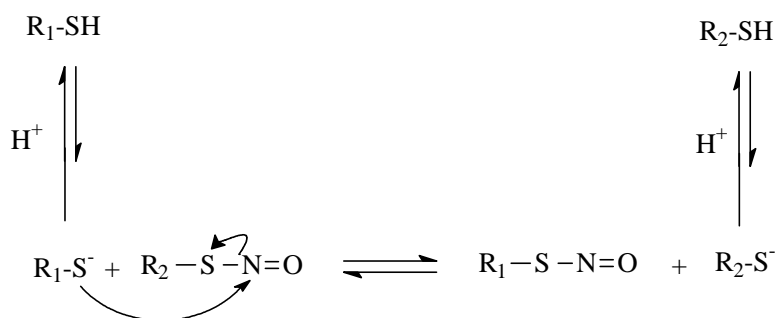


Abb. 66. Vorgeschlagener Mechanismus für die reversible S-Transnitrosylierungs-Reaktion zwischen dem Thiol $\text{R}_1\text{-SH}$ und der S-Nitroso-Substanz R_2SNO in wäßrigen Lösungen bei physiologischem pH-Wert (7,4).

Der exakte Mechanismus der S-Transnitrosylierungs-Reaktion und die Bedingungen, die diese beeinflussen, sind allerdings noch weiter zu erforschen. Untersuchungen von Stamler, Loscalzo und deren Mitarbeitern [16,166] haben gezeigt, daß die Geschwindigkeiten dieser Reaktionen vom pH-Wert abhängig sind. Das könnte bedeuten, daß die Nucleophilie der Thiole, die direkt mit den pK_a -Werten der Sulfhydryl-Gruppen korreliert, die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die physiologischen niedermolekularen Thiole Cystein, Homocystein, GSH und NAC eingesetzt. Sie haben vergleichbare pK_a -Werte (8,33, 8,87, 9,12 und 9,65), aber relativ unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewichtskonstanten.

Meyer *et al.* [30] haben kleinere Reaktionsgeschwindigkeiten für S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zwischen SNALB und GSH oder Cystein als zwischen GSNO und Cystein bzw. GSH und SNC gemessen. Das stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit insofern überein, als daß dort in Gleichgewichten zwischen SNALB und SNC bzw. GSNO und ihren Thiolen das SNALB leicht begünstigt ist.

Überraschend ist, daß nach eigenen Untersuchungen SNhC gegenüber SNC in der S-Transnitrosylierungs-Reaktion $\text{hCys} + \text{SNC} \rightleftharpoons \text{SNhC} + \text{Cys}$ bevorzugt ist, obwohl der pK_a -Wert von Homocystein größer als der von Cystein ist. Da SNhC erheblich stabiler als SNC ist, kann angenommen werden, daß die Stabilität von S-Nitroso-Substanzen und die Bedingungen, die eine Stabilisierung fördern, weitere Parameter sind, welche die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Lage der Gleichgewichte von S-Transnitrosylierungen bestimmen. Die Stabilität von S-Nitroso-Substanzen ist offenbar von der molekularen Struktur abhängig, was unter anderem auf eine sterische Abschirmung der S-Nitroso-Gruppe zurückzuführen ist.

Umgekehrt ist zu erwarten, daß diese sterische Abschirmung wiederum zu einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeiten führt. Das freie Cystein (Cys-34) am Albumin befindet sich in einem abgeschirmten, hydrophoben Bereich des Proteins [95], was die außergewöhnliche Stabilität dieser Substanz zu erklären hilft.

Auf der Basis der in dieser Arbeit ermittelten Plasma-SNALB-Konzentration von etwa 200 nM unter Berücksichtigung der K_{eq} -Werte von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen mit SNALB/ALB (Reaktionen 10 und 11, Tab. 4) und der im Plasma herrschenden Cystein-, GSH- und ALB-Konzentrationen [44,96] berechnet sich die endogene SNC- und GSNO-Konzentration im Plasma von gesunden Menschen zu 2-5 nM. Diese Werte sind bei weitem kleiner als die publizierte Konzentration von niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen im Human-Plasma von 300 nM [64].

Die K_{eq} -Werte der in Tab. 4 dargestellten S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zeigen, daß die Gleichgewichte in Ansätzen, die Homocystein oder NAC enthalten, sehr stark auf der Seite von SNhC bzw. SNAC liegen. Die reduzierten freien Formen von Homocystein und NAC sind im Plasma gesunder Menschen in Konzentrationen von 250 nM [44,96] bzw. < 175 nM [44] vorhanden. Diese Konzentrationen sind etwa 60, 30 bzw. 1500 mal kleiner als die von Cystein, GSH [44,96] und Albumin [60]. Aus diesem Grunde sind die zu erwartenden Konzentrationen von SNAC und SNhC im Plasma trotz ihrer bevorzugten Bildung in S-Transnitrosylierungs-Reaktionen noch deutlich niedriger als die von SNC und GSNO. Es ist nicht davon auszugehen, daß sie in höheren Konzentrationen als 1 nM vorkommen. In der Tat konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich mit einer direkten GC-MS-Methode für SNAC (als PFB-Derivat) zeigen, daß die Konzentration dieser Substanz in menschlichem Plasma und Urin unter 1 nM (Detektionslimit bei 1 nM) liegen muß [150]. Weitere Daten über das Vorkommen von SNAC in Humanplasma sind nicht bekannt.

NAC wird häufig als schleimlösendes Medikament bei Erkältungen eingesetzt. NAC wird *in vivo* hauptsächlich zu Cystein metabolisiert [44,167]. Eine Stunde nach der oralen Gabe von 600 mg NAC in Form von Tabletten an gesunde Probanden konnte in den entsprechenden Plasma-Proben NAC in Konzentrationen um 5 µM gemessen werden [44]. Daher ist es möglich, daß deutlich erhöhte, meßbare SNC- und SNAC-Konzentrationen in solchen Plasma-Proben aufgrund von S-Transnitrosylierungs-Reaktionen, besonders mit SNALB, auftreten könnten. Damit könnte eine Vasodilatation und Hemmung der Plättchenaggregation einher-

gehen, die gelegentlich bei der Einnahme von NAC beobachtet wird. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob diese Effekte auf der SNALB-abhängigen Bildung von SNC und SNAC beruhen oder auf allergische Reaktionen zurückzuführen sind.

Erhöhte Homocystein-Konzentrationen im Plasma wurden bei Patienten mit Gefäßerkrankungen gemessen [143]. Homocystein wird daher als Risikofaktor für Arteriosklerose diskutiert [143]. Die genaue Rolle von Homocystein bei der Entwicklung dieser Erkrankungen ist allerdings noch nicht bekannt. Das meiste Plasma-Homocystein (ca. 70 %) ist über Disulfid-Brücken an Albumin gebunden. In freier Form kommt Homocystein hauptsächlich als gemischtes Disulfid mit Cystein vor [143]. Im Gegensatz zu SNC ist SNhC ein sehr schwacher NO-Donor und ein schwaches S-Transnitrosylierungs-Reagenz (NO^+ -Donor). Allerdings ist dieser Stoff ein potenter Inhibitor der Collagen-induzierten Plättchenaggregation *in vitro* [142]. Ob hohe Plasma-Konzentrationen an Homocystein das physiologische Wirkungsmuster von S-Nitroso-Substanzen verändern, indem sie zu einem biologisch weniger aktiven NO-Pool in Form von SNhC führen und ob auf diese Weise Gefäßerkrankungen verursacht werden, ist noch zu erforschen. Eigenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zufolge konnte allerdings keine Minderung des vasodilatatorischen Effektes von SNC durch co-injiziertes Homocystein beobachtet werden. Ferner war i.v. injiziertes SNhC kein schwächerer Vasodilatator als alle anderen an der Ratte untersuchten S-Nitroso-Substanzen (SNC, GSNO und SNAC [147]). Das spricht gegen eine solche Wirkungsweise. *In vitro*-Untersuchungen zur NO-Freisetzung aus SNC bzw. SNhC haben allerdings gezeigt, daß SNhC auch in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen oder Cystein ein erheblich schwächerer oder zumindest stabilerer NO-Donor als SNC ist (siehe Abb. 27). Da S-Nitroso-Substanzen auch direkt, das heißt über S-Transnitrosylierung, wirken können, ist nicht unbedingt mit einer verminderten Aktivität durch die Bildung von SNhC zu rechnen.

Unter Verwendung von $[^{14}\text{C}]$ Cystein konnte bewiesen werden, daß es bei der Reaktion von SNALB mit Cystein nicht zu einer nennenswerten SNC-Bildung kommt. Es ist allerdings möglich, daß SNC in Gegenwart von SNALB nur ein instabiles Zwischenprodukt ist, das dann weiter zu NO zerfällt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, daß SNC und SNALB in Gegenwart von Cystein auf unterschiedliche Weise die Plättchenaggregation hemmen [168]. Es wurde festgestellt, daß SNALB (in Gegenwart von Cystein) die Plättchen nur cGMP-abhängig, synthetisches SNC aber auch über andere cGMP-unabhängige Mecha-

nismen hemmt. Der cGMP-abhängige Wirkmechanismus könnte daher dem NO, die cGMP-unabhängigen Mechanismen der S-Nitroso-Substanz selbst zugeschrieben werden.

Die große Instabilität von SNC in Gegenwart von Albumin bzw. von SNALB stammendem SNC ist sehr wahrscheinlich auf Albumin- bzw. SNALB-gebundenes Cu^{2+} zurückzuführen, das wie freie Kupfer-Ionen die Reaktion von SNC zu NO katalysieren könnte [22]. Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß mit Cu^{2+} behandeltes SNALB in Abwesenheit von Cystein stabil ist. Es konnte mehrere Tage gelagert werden, ohne daß in nennenswertem Maße aus ihm Nitrit gebildet wurde. In Gegenwart von Cystein hatten hingegen bereits nach 2 min Inkubation in Puffer A (pH 7,0) 37% des verwendeten Cu-S¹⁵NALB zu [¹⁵N]Nitrit reagiert. Es ist dabei gleichgültig, ob das Cu^{2+} am SNALB selbst oder an Albumin gebunden ist, denn „gewöhnliches“ S¹⁵NALB reagierte in Gegenwart von Cu-ALB mit vergleichbarer Geschwindigkeit zu [¹⁵N]Nitrit. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß das im entsprechenden Versuch eingesetzte Cu-S¹⁵NALB auch Cu-ALB enthielt, da bei der S-Nitrosylierung von Plasma-Albumin mit Butylnitrit oder salpetriger Säure nur etwa 50% der freien Thiolgruppen am Cys-34 S-nitrosyliert werden. Möglicherweise spielt Protein-gebundenes Cu^{2+} eine Rolle bei der Steuerung und Entfaltung von biologischen Signalen durch S-Nitroso-Substanzen. Protein-gebundenes Cu^{2+} würde ihre Funktion als NO-Donor verstärken, während ihre Wirkungsweise über S-Transnitrosylierungen (z.B. reversible Hemmung von Enzymen durch S-Nitrosylierung von freien Thiolgruppen) dadurch unterdrückt würde.

Bei allen anderen überprüften S-Transnitrosylierungs-Reaktionen, an denen Cystein und [¹⁴C]Cystein beteiligt war, konnte die Bildung nennenswerter Mengen von [¹⁴C]SNC nachgewiesen werden. Selbst die Inkubation von nicht-markiertem SNC mit [¹⁴C]-markiertem Cystein führte zur Bildung von [¹⁴C]SNC. Das zeigt, daß S-Transnitrosylierungen immer dann ablaufen, wenn S-Nitroso-Substanzen in Gegenwart von Thiolen vorliegen, das heißt selbst dann, wenn es sich um das korrespondierende Thiol handelt.

Es wurde vorgeschlagen, daß die S-Transnitrosylierung von Proteinen ein Signaltransduktions-Mechanismus sein könnte, der mit der Phosphorylierung vergleichbar ist [17]. Ob die Wirkung von S-Nitroso-Substanzen auf die Vasodilatation und Plättchenaggregation *in vivo* ganz oder teilweise auf S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zurückzuführen ist oder auf der Freisetzung von NO beruht, ist noch genauer zu untersuchen. Die reversible Inhibition von Enzymen findet allerdings ausschließlich über deren S-Transnitrosylierung statt [169].

6.2.2 S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in menschlichem Plasma und Blut

Vorangegangene Publikationen weisen darauf hin, daß S-Transnitrosylierungen auch *in vivo* im Blut stattfinden. So wurde berichtet, daß die i.v. Infusion des NO-Donors [1-Hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-3-aminopropyl]-3-methyl-1-triazin (NOC7) in Ratten zur Bildung niedriger Konzentrationen von S-Nitroso-Substanzen im Plasma und zu einer NO-induzierten Blutdrucksenkung führen, die bei Ratten mit verringerten Plasma-Albumin-Konzentrationen von kürzerer Dauer ist als bei gesunden Ratten [94]. Dieses Ergebnis wurde auf die intermediäre Bildung von SNALB *in vivo* zurückgeführt. Keaney *et al.* haben an Hunden gezeigt, daß i.v. injiziertes SNALB eine längere hypotensive Wirkung hat als GTN oder SNC [170]. Diese Beobachtungen können möglicherweise auf die im Vergleich zu NO [93] und SNC [5,48] lange Halbwertszeit von SNALB [17,60] im Plasma zurückgeführt werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß S-Transnitrosylierungs-Reaktionen auch *in vivo* im Blut ablaufen. In der Arbeit von Minamyama *et al.* [94] wurden S-Nitroso-Substanzen im Plasma ohne vorherige Isolierung mit der Saville-Methode gemessen. Es ist daher nicht gewiß, ob tatsächlich S-Nitroso-Substanzen oder andere NO-Donatoren im Plasma quantifiziert wurden. In der Arbeit von Keaney *et al.* [170] wurden nur hämodynamische Effekte gemessen, nicht aber die Plasma-Konzentration von S-Nitroso-Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bildung von SNALB in menschlichem Plasma und Blut über zwei verschiedene Mechanismen *in vitro* untersucht:

1. S-Transnitrosylierungs-Reaktionen von Albumin durch die zwei wichtigsten physiologischen niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO bzw. durch das als möglicher Parameter in Zusammenhang mit Gefäßkrankheiten stehende SNhC (s.o.)
2. S-Nitrosylierung von Albumin durch NO [170] und zwei Medikamente, die NO-ähnliche Aktivitäten *in vivo* und *in vitro* besitzen, nämlich SNP und GTN.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die S-Nitrosylierungen von Albumin durch GSNO, SNC und SNhC sowie durch NO über zwei Mechanismen zur Bildung von zirkulierendem SNALB führen können. Dabei kommt es, wie auch in gepufferten wäßrigen Lösungen, bei den schnellen S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zu deutlich höheren Ausbeuten an SNALB als über die Reaktion von NO mit Albumin. Es wurde berichtet, daß die Wirkung von GTN und SNP auf die Interaktion von reduzierten niedermolekularen Thiolen wie Cystein und GSH oder Albumin mit diesen Substanzen, z.B. nach vorangegangener enzyma-

tischer Reaktion (wie bei GTN), zurückzuführen ist. Bei ihrer Wirkung wurden S-Nitroso-Substanzen als aktive Intermediate vorgeschlagen [5,151,171,172,173]. Die Inkubation von Plasma und Blut mit SNP oder GTN *in vitro* führte aber zu keiner Bildung von SNALB im Plasma. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Chong *et al.* [173] überein. Diese Arbeitsgruppe fand heraus, daß eine Thiol-abhängige Zunahme des Metabolismus von GTN *in vitro* in menschlichem Plasma nicht mit einer gesteigerten SNALB-Bildung einherging [173]. Es konnte gezeigt werden, daß die Glutathion-S-Transferasen im Plasma für den inhibitorischen Effekt von GTN auf die Aggregation gewaschener Plättchen verantwortlich sind [174]. Aus diesem Grunde könnte bei der Reaktion von GTN mit Plasma-Glutathion-S-Transferasen über die intermediäre Bildung von GSNO schließlich SNALB entstehen.

SNC S-transnitrosyliert Albumin in Human-Plasma und Blut sehr schnell und effizient. Bereits 6 s nach der SNC-Zugabe zum Plasma hatten etwa 18 bzw. 24 % des zugegebenen SNC zu SNALB reagiert (Abb. 35). In der gleichen Zeit nahm die SNC-Konzentration um 43 bzw. 64 % ab. Das bedeutet, daß 25-30 % des SNC zu anderen Produkten reagiert haben. Die Zunahme der Plasma-Konzentration von Nitrit, die aus 100 µM SNC gebildet wurde, betrug 3-4 µM nach 6 s und 13 µM nach 1 h. Es ist folglich unklar, zu welchen stickstoffhaltigen Produkten das restliche SNC reagiert hat. In Gegenwart von DTPA wurden geringere SNALB-Konzentrationen gebildet als in seiner Abwesenheit. Eine Erklärung hierfür ist die niedrigere Konzentration reduzierter Thiolgruppen in solchen Plasma-Proben: Bei einer geringeren Konzentration reduzierter Thiol-Gruppen am Plasma-Albumin stellt sich das S-Transnitrosylierungs-Gleichgewicht nicht so stark zugunsten von SNALB ein ($\text{SNC} + \text{ALB} \rightleftharpoons \text{Cys} + \text{SNALB}$).

Das gebildete SNALB zerfällt in Plasma wesentlich langsamer als SNC. Das Gleichgewicht zwischen SNALB und SNC scheint also im Plasma instabil zu sein. In gepufferten wäßrigen Lösungen stellte sich hingegen bei der Reaktion $\text{Cys} + \text{SNALB} \rightleftharpoons \text{SNC} + \text{ALB}$ (Reaktion 11, Tab. 4) ein stabiles Gleichgewicht ein. Es ist aber zu bedenken, daß das Cystein, das bei der S-Transnitrosylierungs-Reaktion von SNC mit Albumin im Plasma entstanden bzw. endogenen Ursprungs ist, schneller oxidiert wird als in wäßrigen gepufferten Lösungen. Cystein wird daher auch schneller dem Gleichgewicht entzogen. Das bedeutet, daß sich das Gleichgewicht der Reaktion $\text{Cys} + \text{SNALB} \rightleftharpoons \text{SNC} + \text{ALB}$ im Laufe der Zeit immer weiter zugunsten von SNALB verschiebt. Zusätzlich reagiert immer weniger SNALB über die intermediäre Bildung von instabilem SNC zu Nitrit. Die Sulfhydrylgruppen, die aus reduziertem Cys-34

am Albumin stammen, werden vermutlich deutlich langsamer oxidiert als freies Cystein, da sich das Cys-34 geschützt in einem hydrophoben Bereich des Albumins befindet [95]. Die Konzentration von SNALB stieg im Laufe der Inkubationszeit leicht an. Auch das ist auf die Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten von SNALB zurückzuführen, denn das Verhältnis Albumin zu Cystein im Plasma wird mit der Zeit immer größer. Ferner ist davon auszugehen, daß sich das Gleichgewicht nach der initialen Phase (6 s), anders als bei den niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen, noch nicht richtig eingestellt hat.

Bei der Untersuchung der Transnitrosylierungs-Reaktion $\text{SNC} + \text{ALB} \rightleftharpoons \text{Cys} + \text{SNALB}$ in Plasma und Blut betrug die Konzentration freier Sulfhydrylgruppen wenige Sekunden nach der Zugabe von SNC (100 μM) etwa 300 μM in Form von Albumin und 50 μM in Form von Cystein. Die SNALB- und SNC-Konzentration betrug je ca. 30 μM . Die Gleichgewichtskonstante der S-Transnitrosylierungs-Reaktion berechnet sich unter diesen Bedingungen zu $K_{\text{eq}} \approx 0,17$. Dieser Wert ist um einen Faktor von ca. 10 kleiner als der in gepufferten wäßrigen Lösungen ermittelte von $K_{\text{eq}} = 1,33$ (siehe Reaktion 11, Tab. 4). Unter der Annahme, daß die SH-Gruppen von Albumin und Cystein in gleichem Maße oxidiert werden, berechnet sich für den Zeitpunkt von 60 min ein K_{eq} -Wert von 1,0. Dieser Wert stimmt deutlich besser mit dem für die Reaktion 11 in gepufferten wäßrigen Lösungen ermittelten K_{eq} -Wert überein.

SNALB ist in Vollblut und Plasma *in vitro* außerordentlich stabil ($t_{1/2}$ (Vollblut) = 5,5 h, [60]). SNC ist selbst in EDTA-Plasma eine recht instabile S-Nitroso-Substanz und in Citrat-Plasma noch deutlich instabiler. Der Komplexbildner DTPA wirkt in Citrat-Plasma zwar stabilisierend auf SNC, aber bei weitem nicht so stark wie EDTA. In gepufferten wäßrigen Lösungen wirkt Cystein stark stabilisierend auf SNC. Die Halbwertszeit von SNC in gepufferten wäßrigen Lösungen beträgt (in Abwesenheit von Thiolen) 6 min, in Gegenwart des Cu^{1+} -Chelators Batocuproinsulfonat (10 μM) hingegen 58 min [48]. Die besonders stark stabilisierende Wirkung von EDTA auf SNC in Plasma ist vermutlich auf zwei Effekte zurückzuführen, nämlich die antioxidierende Wirkung auf Thiolgruppen und die Wirkung als Cu-Komplexbildner. DTPA wirkt hingegen nur als Cu-Komplexbildner. Thiole wie Cystein reagieren mit Cu^{2+} -Ionen zu Thiolaten und senken auf diese Weise die Konzentration freier Cu^{2+} -Ionen. So wirkt sich die antioxidative Eigenschaft von EDTA zusätzlich senkend auf die Konzentration freier Cu^{2+} -Ionen aus. Hinzu kommt, daß die größere Stabilität von Cystein sich in der Reaktion $\text{Cys} + \text{SNALB} \rightleftharpoons \text{SNC} + \text{ALB}$ zugunsten von SNC auswirkt. In EDTA-Plasma werden

bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen dennoch höhere SNALB-Konzentrationen gebildet als in Citrat-Plasma. Dieser scheinbare Widerspruch kommt dadurch zustande, daß SNC in EDTA-Plasma stabiler ist und so Albumin und SNC für eine längere Zeit miteinander zu SNALB reagieren können.

SNC ist gegenüber GSNO und SNhC nicht nur in gepufferten wäßrigen Lösungen, sondern auch in Plasma oder Blut ein potenteres S-Transnitrosylierungs-Reagenz. SNC führte generell zu den höchsten SNALB-Konzentrationen im Plasma. Die SNALB-Konzentrationen im Plasma waren nach der Inkubation von SNC, GSNO und SNhC in Vollblut stets höher als nach ihrer Inkubation in Plasma. Das könnte daran liegen, daß SNC und SNhC nur langsam in die Erythrozyten aufgenommen werden und GSNO gar nicht. Dadurch waren in Experimenten mit Vollblut die realen Konzentrationen von SNC, GSNO und SNhC höher als in den entsprechenden Experimenten in Plasma (denn die zugegebenen Konzentrationen von SNC, GSNO und SNhC bezogen sich immer auf das gesamte Blut-Volumen).

Metallionen und besonders Kupfer-Ionen spielen eine wichtige Rolle in der Chemie und Biochemie von S-Nitroso-Substanzen. Sogar wenn Kupfer-Ionen an Proteine gebunden sind, können sie eine NO-Freisetzung aus S-Nitroso-Substanzen bewirken [26]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [48] zeigten, daß die Stabilität von SNC um einen Faktor von 10000 stärker durch Cu^{2+} -Ionen beeinflusst wird als die Stabilität von GSNO. Eigene Vorarbeiten [59] zeigten, daß die Kombination von Cu^{2+} (500 nM) mit Cystein (50 μM) SNALB genauso effektiv zu Nitrit zersetzt wie HgCl_2 (1 mM). Die Mechanismen sind allerdings unterschiedlich: Während in Gegenwart von HgCl_2 die Entstehung von Nitrit aus SNALB nicht über die intermediäre NO-Bildung abläuft (siehe Abb. 1), ist das, zumindest zum Teil, bei der Zersetzung mit der Kombination aus Cu^{2+} -Ionen und Cystein der Fall [48,59].

Physiologisch vorkommendem Cystein wird eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung und Regulation der antiaggregatorischen Wirkung von SNALB zugeschrieben [168]. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß der Mechanismus der Cystein-vermittelten Wirkung von SNALB vermutlich auf die intermediäre Bildung von SNC aus SNALB und Cystein zurückgeht. In der Mikroumgebung des Albumin-Moleküls ist SNC allerdings wahrscheinlich höchst instabil und setzt NO frei. Teilweise könnte es mit anderen Gruppen des Albumin-Moleküls reagieren. Für die NO-Bildung aus aus SNALB stammendem SNC könnten an Albumin gebundene Kupfer-Ionen verantwortlich sein.

Es ist bekannt, daß 10 % der Cu^{2+} -Ionen im Plasma, das bedeutet 2 μM , fest an Albumin gebunden sind [95]. Die Bindungs-Konstante beträgt $1,6 \cdot 10^{16}$ [175]. Die restlichen 90 % der Cu^{2+} -Ionen im Plasma sind an α -Globulin gebunden [95]. Cu^{2+} -enthaltendes SNALB ist in menschlichem heparinisiertem Blut stabil [60] und setzt nicht spontan NO frei. In Gegenwart von Cystein ist SNALB auch in Abwesenheit von extern zugegebenen Cu^{2+} -Ionen deutlich instabiler. Daher kann angenommen werden, daß Albumin-gebundene Cu^{2+} -Ionen die Cystein-vermittelte NO-Freisetzung aus SNALB über SNC katalysieren. Die hemmende Wirkung von SNALB auf die Plättchenaggregation kann nicht direkt über SNC vermittelt werden, da Untersuchungen zur Hemmwirkung von SNC auf Plättchen gezeigt haben, daß diese z.T. cGMP-unabhängig ist [47]. Die antiaggregatorische Wirkung von SNALB in Gegenwart von Cystein wird hingegen ausschließlich cGMP-abhängig vermittelt [168]. Die cGMP-abhängige Vermittlung der Inhibition der Plättchenaggregation wird dem NO zugesprochen, obwohl nicht auszuschließen ist, daß auch S-Nitroso-Substanzen per se die sGC aktivieren können. Die cGMP-unabhängigen Wirkungsmechanismen von SNC könnten hingegen auf eine direkte Beteiligung von SNC, z.B. über die Hemmung der Thromboxansynthese und S-Nitrosylierung von Membran-Proteinen [47], zurückgeführt werden.

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen zwischen den niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC, GSNO und SNhC und der Sulfhydryl-Gruppe des Cys-34 am Albumin in Plasma und Blut sind die effizientesten Mechanismen, die zur Bildung von SNALB führen können. NO ist ebenfalls in der Lage, in Plasma oder Blut SNALB zu bilden, aber in erheblich geringerem Maße. Die NO-Donoren GTN und SNP sind dazu – zumindest *in vitro* – überhaupt nicht fähig.

Die *in vitro*-Untersuchungen der S-Transnitrosylierungs-Reaktionen in Blut und Plasma sprechen dafür, daß diese Reaktionen auch *in vivo* im Blut stattfinden könnten. Die im vorangegangenen Abschnitt anhand der endogenen SNALB-, Cystein- und GSH- Konzentrationen im Plasma (200 nM, 10 μM bzw. 5 μM) berechneten endogenen Konzentrationen von SNC und GSNO (2-5 nM) könnten somit zutreffen.

Wichtige Parameter für die Stabilität und Wirkungsweise der S-Nitroso-Substanzen sind die im Plasma vorliegende Konzentration des reduzierten Cysteins und die Konzentration von freien und an Albumin und andere Plasma-Proteine gebundenen Kupfer-Ionen.

6.2.3 Rolle von Erythrozyten bei dem Metabolismus und der Vermittlung der biologischen Aktivitäten von S-Nitroso-Substanzen

Es ist bekannt, daß NO in Erythrozyten durch Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Nitrat metabolisiert wird [107]. Ferner wurde berichtet, daß SNHb in Erythrozyten vorkommt [102]. Seine stabilere, oxygenierte Form ($\text{SNO-Hb[Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$) liegt in arteriellem Blut in Konzentrationen von 300 nM vor [102]. Laut einer Theorie von Stamler *et al.* [102] findet durch den Übergang von $\text{SNO-Hb[Fe}^{\text{II}}\text{O}_2$ in die deoxygenierte Form $\text{SNO-Hb[Fe}^{\text{II}}]$ im venösen Blut eine Destabilisierung der S-Nitroso-Gruppe von SNHb und die Bildung von intrazellulärem GSNO bzw. Freisetzung von NO statt. Auf diese Weise könnten Erythrozyten die endotheliale NO-Produktion in venösen Kapillar-Gefäßen unterstützen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Erythrozyten einen wesentlichen Einfluß auf den Metabolismus von zirkulierenden S-Nitroso-Substanzen haben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Erythrozyten als Vermittler der biologischen Wirkung von S-Nitroso-Substanzen fungieren können.

Zum ersten Mal wurde ein transmembranöses, selektives Transportsystem für L-SNC in das Cytosol der Erythrozyten gezeigt. Bei diesem Transport kommt es neben der Bildung von Nitrat auch zur S-Transnitrosylierungs-Reaktion von intrazellulärem GSH mit transportiertem SNC unter Bildung von GSNO. Stamler *et al.* haben beobachtet, daß die Inkubation von GSNO mit Erythrozyten im Gegensatz zu SNC nicht zur Bildung von SNHb führte [102]. Dieses Phänomen wurde jedoch nicht auf die Unfähigkeit von GSNO zurückgeführt, Erythrozyten-Membranen zu durchdringen. In dieser Arbeit wurde hingegen der Beweis erbracht, daß L-SNC als einzige physiologische S-Nitroso-Substanz in nennenswertem Maße zu diesem transmembranösen Transport in der Lage ist. Sein optisches Isomer D-SNC wird wesentlich langsamer in das Erythrozyten-Cytosol transportiert. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Existenz eines selektiven Transportsystems für SNC in der Erythrozytenmembran.

Es wurde bestätigt, daß NO in das Cytosol von Erythrozyten gelangen kann und dort zu Nitrat oxidiert wird. Dieses NO führt jedoch nicht zur Bildung von detektierbaren Konzentrationen an intrazellulärem GSNO. Stattdessen führt intrazelluläres NO im Gegensatz zu SNC zu einer deutlichen Verringerung der cytosolischen GSH-Konzentration. Hierbei wird vermutlich GSSG gebildet.

Intrazelluläres GSNO ist selbst nicht in der Lage, das Cytosol von Erythrozyten zu verlassen. Es ist wahrscheinlich, daß diese Beobachtung auch auf andere Zellen, in denen NO und GSNO produziert wird (wie Endothelzellen oder Blut-Plättchen [176]), übertragbar ist. Es hat sich allerdings gezeigt, daß auch der Metabolismus und die biologische Wirkung anderer S-Nitroso-Substanzen wie GSNO durch Erythrozyten beeinflusst werden kann. Durch Coinkubation von GSNO mit Erythrozyten in Gegenwart von verschiedenen Cystein-Konzentrationen konnte sowohl bei gewaschenen Erythrozyten als auch im Vollblut gezeigt werden, daß dem Cystein eine zentrale Rolle beim Metabolismus aller S-Nitroso-Substanzen über die Erythrozyten zukommt. Über S-Transnitrosylierungs-Reaktionen der S-Nitroso-Substanzen mit Cystein kann extrazellulär SNC gebildet werden, das dann in die Erythrozyten transportiert wird. Dort wird es zu Nitrat metabolisiert oder geht andere Reaktionen ein.

Auch bei der Vermittlung der biologischen Aktivität von intrazellulärem GSNO in den Erythrozyten ist die S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit Cystein essentiell: Mit GSNO „beladene“ Erythrozyten führten nur dann zu einer deutlichen Inhibition von Plättchen in plättchenreichem Plasma, wenn in den Ansätzen extern zugesetztes Cystein vorhanden war. Das läßt vermuten, daß durch S-Transnitrosylierung im Cytosol der Erythrozyten gebildetes SNC den Transport von NO^+ -Äquivalenten aus den Erythrozyten in das Plasma bewirkt. Dieses SNC kann im Plasma mit Albumin zu SNALB (und Cystein) reagieren oder direkt eine biologische Wirkung wie die Inhibition der Plättchenaggregation vermitteln. In der Tat konnte nachgewiesen werden, daß intrazelluläres GSNO in Erythrozyten zur Bildung von SNALB führen kann, dessen antiaggregatorische Wirkung wiederum Cystein-abhängig ist.

Der Transport von extrazellulärem SNC in das Cytosol von Erythrozyten wurde genauer untersucht. Es stellte sich dabei heraus, daß er durch andere Aminosäuren, insbesondere Serin und Cystein, gehemmt werden kann. Die Transport-Geschwindigkeit von SNC in das Erythrozyten-Cytosol ist durch Steigerung der extrazellulären SNC-Konzentration nicht beliebig zu steigern. Beide Beobachtungen sprechen für einen Carrier-Transport von SNC. SNC reagiert in Erythrozyten schnell und nahezu quantitativ weiter und ist daher nicht als Parameter für seinen Transport geeignet. Da intrazelluläres GSNO aus intrazellulärem SNC und GSH in den Erythrozyten nicht quantitativ durch S-Transnitrosylierung gebildet wird, ist es als Maß für den SNC-Transport in das Erythrozyten-Cytosol ebenfalls ungeeignet. Die exakte Bestimmung von Cystein gestaltete sich im Cytosol von Erythrozyten als schwierig, da die Aufarbeitung der Proben zu relativ großen Fehlern führte. Die Inkubations-Bedingungen, insbeson-

dere die Temperatur, waren bei Experimenten mit gewaschenen Erythrozyten schwierig konstant zu halten. Daher war es nicht möglich, z.B. durch Lineweaver-Burk-Auftragungen, exakte kinetische Daten für diesen Transport zu ermitteln.

Ein besonders wichtiges Ergebnis bei der Untersuchung der Selektivität des Transportes von SNC in Erythrozyten ist, daß SNC signifikant schneller als Cystein in das Cytosol von Erythrozyten transportiert wurde. Selbst wenn SNC in das Cytosol von Erythrozyten über das gleiche Transport-System transportiert wird, das für den Transport von Cystein verantwortlich ist, ist dieses Ergebnis als ein überzeugendes Indiz für die physiologische Relevanz dieses Transportes zu werten.

Der Verlauf der intrazellulären GSNO-Konzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären SNC-Konzentration zeigt einen sigmoiden Verlauf. Das könnte bedeuten, daß bei niedrigen SNC-Konzentrationen die Nitrat-Bildung stärker begünstigt ist als bei höheren SNC-Konzentrationen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß SNC zunächst zur (S)-Nitrosylierung von Hb oder auch Membran-Proteinen führt. Eine Bestimmung von SNHb im Erythrozyten-Cytosol konnte in dieser Arbeit nicht realisiert werden. Membran-Proteine konnten ebenfalls nicht untersucht werden.

Auch in Vollblut führte externes SNC zur intrazellulären Bildung von GSNO. Die GSNO-Konzentration war allerdings erheblich niedriger als nach Inkubation mit gewaschenen Erythrozyten. Nach 20 min Inkubation von 600 μM SNC in Vollblut betrug die intrazelluläre GSNO-Konzentration nur 3,8 μM , während sie unter gleichen Bedingungen in gewaschenen Erythrozyten um etwa Faktor 10 größer war. In Anwesenheit von Plasma ist die Bildung von Plasma-SNALB gegenüber der intrazellulären GSNO-Bildung bevorzugt. Die SNALB-Konzentration im entsprechenden Ansatz betrug ca. 100 μM . Nach der Inkubation von gewaschenen Erythrozyten bzw. Vollblut mit SNC waren die intrazellulären Cystein-Konzentrationen in etwa gleich groß. Das deutet darauf hin, daß der Transport von SNC in die Erythrozyten auch in Vollblut eine relevante Rolle spielt. Die niedrigen intrazellulären GSNO-Konzentrationen nach der Inkubation von SNC in Vollblut kommen offenbar dadurch zustande, daß das GSNO intrazelluläres Cystein S-nitrosyliert und das gebildete SNC wieder aus dem Erythrozyten heraustransportiert wird. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß GSNO im Cytosol von Erythrozyten, die sich in physiologischer NaCl befanden, sehr stabil war, während die Reinkubation von gewaschenen, „GSNO-beladenen“ Erythrozyten mit ihrem

Original-Plasma zu einer schnellen Abnahme der intrazellulären GSNO-Konzentration führte. Die intrazelluläre GSNO-Konzentration fiel in Erythrozyten, die in physiologischer NaCl-Lösung inkubiert wurden, wiederum um so schneller, je mehr Cystein dieser physiologischen NaCl-Lösung zugesetzt worden war.

Die Inkubation von SNC mit gewaschenen Erythrozyten führte vorwiegend zur Bildung von biologisch inaktivem Nitrat und zu deutlich kleineren Mengen an biologisch aktivem GSNO im Erythrozyten-Cytosol. Auch andere S-Nitroso-Substanzen wie SNALB und GSNO, die selbst nicht in das Cytosol von Erythrozyten gelangen können, werden in Erythrozyten zu Nitrat metabolisiert. Dies geschieht um so schneller, je mehr Cystein im Plasma vorhanden ist (bzw. extern zugegeben wurde). Eine Hauptaufgabe der Erythrozyten in Bezug auf zirkulierende S-Nitroso-Substanzen ist ohne Zweifel ihre Metabolisierung zu ungiftigem Nitrat. Eine weitere Aufgabe der Erythrozyten könnte die Speicherung von NO-Äquivalenten in Form von GSNO und SNHb sein. Quantitativ überwiegt die inaktivierende Rolle der Erythrozyten über die, die der Speicherung und dem Transport von NO dient. Aufgrund der hohen Potenz von S-Nitroso-Substanzen könnte diese zweite Funktion der Erythrozyten *in vivo* von großer Bedeutung sein. In der Zirkulation liegen S-Nitroso-Substanzen in einem dynamischen Gleichgewicht nebeneinander vor. *In vivo* könnte es bei einer konstanten SNALB- und SNC-Konzentration im Plasma trotz des relativ langsamen Transportes zu einer Akkumulation von GSNO und auch SNHb in Erythrozyten kommen. Intrazelluläres GSNO und extrazelluläre (Plasma-) S-Nitroso-Substanzen wären *in vivo* über Cystein/SNC miteinander im Gleichgewicht. Die in 5.2.7 in gepufferten wäßrigen Lösungen ermittelten Gleichgewichtskonstanten für S-Transnitrosylierungs-Reaktionen scheinen auch im Cytosol von menschlichen Erythrozyten gültig zu sein. So gelang es, die intrazelluläre SNC-Konzentration in gewaschenen menschlichen Erythrozyten nach ihrer Inkubation mit SNC anhand der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion $\text{GSH} + \text{SNC} \rightleftharpoons \text{GSNO} + \text{Cys}$ (Reaktion 1, Tab. 4) richtig zu berechnen.

Sollte die Hypothese von Stamler *et al.*, daß SNHb eine zusätzliche Quelle für EDRF-ähnliche Wirkung in venösen Kapillargefäßen ist, richtig sein, so ist dieser hinzuzufügen, daß die Wirkung von SNHb entweder über die Freisetzung von NO oder über die S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit Cystein zu SNC vermittelt wird. Sowohl NO als auch SNC könnten aus den Erythrozyten in das Plasma gelangen. Da S-Nitroso-Substanzen in Gegenwart hoher Konzentrationen der korrespondierenden Thiole vergleichsweise stabil sind, ist die letztgenannte

Möglichkeit wahrscheinlicher. Im Plasma ist die Freisetzung von NO aus SNC wiederum durch freie und Protein-gebundene Kupfer-Ionen katalysiert.

6.2.4 Untersuchungen zum Metabolismus von S-Nitroso-Substanzen *in vivo* an der Ratte

Die Bolus-Injektion mit anschließender Langzeitinfusion von GS¹⁵NO in die Ratte führte zur schnellen Bildung von S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrit im Blut. Aus S¹⁵NALB, [¹⁵N]Nitrit und weiteren unbekannten Metaboliten von GS¹⁵NO wurde anschließend langsam [¹⁵N]Nitrat gebildet. Da die Konzentration von [¹⁵N]Nitrat bei weitem größer als die von S¹⁵NALB und [¹⁵N]Nitrit war, könnte die Hauptmenge von [¹⁵N]Nitrat über andere Wege entstanden sein.

Anhand dieses Experiments wurde eine Halbwertszeit von S¹⁵NALB *in vivo* von 23 min ermittelt. Die *in vitro* in menschlichem Blut ermittelte Halbwertszeit von SNALB beträgt hingegen 5,5 h [60].

Die berechneten Wiederfindungsraten von GS¹⁵NO in Form von [¹⁵N]Nitrat von 0,6 bzw. 1,13 % belegen, daß unter diesen Bedingungen nur ein sehr geringer Teil des GS¹⁵NO nach seiner i.v. Infusion zu Nitrat metabolisiert wurde. Vermutlich werden unphysiologisch hohe Konzentrationen von S-Nitroso-Substanzen *in vivo* auf noch unbekanntem Wege metabolisiert. Die Detektion von NO in der Atemluft von Menschen [100] könnte ein Hinweis darauf sein, daß S-Nitroso-Substanzen auch in der Lunge unter NO-Freisetzung metabolisiert werden. Dieser Weg wurde hier nicht untersucht.

Die intravenöse Bolus-Injektion von [¹⁴C]SNC in eine Ratte und die anschließende Messung der Radioaktivität in einzelnen Organ-Proben hat ergeben, daß ein Großteil der injizierten Radioaktivität in Niere, Leber und Lunge wiederzufinden war. Diese Radioaktivität stammt aus dem radioaktiv markierten [¹⁴C]Cyst(e)in, also dem Stickstoff-freien Metaboliten von [¹⁴C]SNC. Das Ergebnis unterstützt die oben geäußerte Vermutung, daß SNC zum Teil in der Lunge unter NO-Freisetzung reagiert. Von der injizierten Gesamtradioaktivität konnte im Blut der Ratte etwa 41 % wiedergefunden werden, also bei weitem mehr als von den stickstoffhaltigen Metaboliten S¹⁵NALB, [¹⁵N]Nitrit und [¹⁵N]Nitrat nach der i.v. Infusion von GS¹⁵NO. Untersuchungen an der Ratte mit am Stickstoff radioaktiv markiertem SNC oder GSNO (mit dem sehr instabilen Isotop ¹³N) könnten endgültig klären, ob S-Nitroso-Substanzen in der Lunge unter NO-Bildung metabolisiert werden bzw. sich zersetzen. Das Auf-

treten von Radioaktivität in der Atemluft des Versuchstieres wäre dafür ein eindeutiger Beweis. Das *in vivo*-Experiment mit [^{14}C]SNC führte zu einer Bestätigung der Rolle von Erythrozyten bei der Metabolisierung von S-Nitroso-Substanzen: Es konnte ein zeitlich verzögertes und dann wieder abklingendes Auftreten von Radioaktivität in den Erythrozyten-Fractionen gemessen werden. Diese Beobachtung deutet auf einen Transport von [^{14}C]SNC in das Cytosol der Erythrozyten hin. Die Haupt-Radioaktivität im Blut wurde allerdings in den Plasma-Fractionen der Blutproben gemessen. Es ist nicht auszuschließen, daß das i.v. injizierte [^{14}C]SNC vor seinem Transport in das Cytosol der Erythrozyten bereits zu [^{14}C]Cystein reagiert hat.

6.2.5 Entstehung von GSNO als Produkt der NOS-katalysierten Reaktion von L-Arginin

Mit der eigens für diese Fragestellung entwickelten Methode konnte die NOS-katalysierte Bildung von GS ^{15}NO aus L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin gezeigt werden. Die Bildung von GS ^{15}NO betrug jedoch nur etwa 3-5 % der [^{15}N]Nitrit-Bildung, selbst unter Bedingungen, unter denen Mayer *et al.* [14] GSNO-Konzentrationen gemessen haben, die etwa 30 % der gleichzeitig entstandenen Citrullin-Konzentration betrugen. Die Ergebnisse von Schmidt *et al.*, die GSNO in Konzentrationen um 5 % der gleichzeitig entstandenen Citrullin-Menge gemessen haben [13], stimmen eher mit denen dieser Arbeit überein. Eigene Untersuchungen zeigten, daß die Ausbeute von [^{15}N]Nitrit aus 100 μM L-[$^{15}\text{N}_2$]Arginin in NOS-Ansätzen nach vollständiger Umsetzung etwa 30 % beträgt. Eigene Voruntersuchungen mit dem HPLC-System A (Eluent A, pH 2), das mit dem von Mayer *et al.* verwendeten HPLC-System vergleichbar ist, erbrachten zunächst auch den Nachweis der Bildung von GS ^{15}NO -Konzentrationen in NOS-Ansätzen, die in der Größenordnung der von Mayer *et al.* publizierten Werte lagen. Genauere Untersuchungen führten jedoch zum Ergebnis, daß dieses GS ^{15}NO größtenteils während der Chromatographie artifiziell aus GSH und [^{15}N]Nitrit gebildet wurde. Diese artifizielle Bildung von GS ^{15}NO wurde durch das Ausweichen auf ein HPLC-System mit pH-neutralem Eluenten (System B, Eluent D) vermieden. Die zweite Methode, mit der Mayer *et al.* GSNO in NOS-Ansätzen nachgewiesen haben, basiert auf der indirekten elektrochemischen Detektion von NO mittels NO-Sensor. Das NO wurde dabei mittels Cu^{1+} -Ionen aus GSNO freigesetzt [14]. NO-Messungen in NOS-Ansätzen mit der NO-Elektrode haben sich in der vorliegenden Arbeit als ungeeignet erwiesen.

Untersuchungen zur Stabilität von GS^{15}NO in NOS-Ansätzen haben ergeben, daß seine Halbwertszeit unter diesen Bedingungen etwa 50 min beträgt. Mangelnde Stabilität von GSNO in NOS-Ansätzen scheidet daher als Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gemessenen niedrigen Konzentrationen von GS^{15}NO in GSH-haltigen NOS-Ansätzen aus.

Die Anwesenheit von GSH in NOS-Ansätzen führte zu einer deutlichen Steigerung der Nitrit- und Nitrat-Produktion. Die Nitrit-Bildung in Abwesenheit von GSH betrug nur etwa 1/3 der Nitrat-Bildung. In Gegenwart von GSH war sie jedoch genauso groß oder größer als die Nitrat-Bildung. Ein stimulierender Effekt von GSH auf die NOS-Aktivität wurde auch von Hoffmann *et al.* beobachtet [177]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unbekannt. Es wird davon ausgegangen, daß die Steigerung der NOS-Aktivität durch GSH zum Teil auf die antioxidative Wirkung von GSH auf Thiol-Gruppen der NOS zurückzuführen ist [177].

In wäßrigen Lösungen wird NO in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ausschließlich zu Nitrit oxidiert [35]. Für die in NOS-Ansätzen beobachtete Nitrat-Bildung muß daher ein anderer Mechanismus existieren. Ein solcher Mechanismus könnte die Bildung von Peroxynitrit aus NO und $\text{O}_2^{\cdot -}$ beinhalten. Sowohl NO als auch $\text{O}_2^{\cdot -}$ sind Produkte der NOS [14]. Das bei physiologischem pH-Wert sehr instabile Peroxynitrit zerfällt hauptsächlich zu Nitrat [178]. In Gegenwart von GSH könnte Peroxynitrit mit GSH zu GSNO_2 reagieren [50]. Die Stabilität und die Reaktion von GSNO_2 sind zur Zeit kaum untersucht. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist eine Bildung von Nitrat aus GSNO_2 möglich. Auch in NOS-Ansätzen könnte sich GSNO_2 bilden. Da jedoch nur ein sehr kleiner Prozentsatz von Peroxynitrit mit Thiolen und anderen Elektrophilen zu Nitro-Verbindungen reagiert, ist eine GSNO_2 -Bildung als sehr gering im Vergleich zur Bildung von Nitrit bzw. Nitrat einzuschätzen. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um diesen Sachverhalt zu klären.

Balazy *et al.* haben mittels ESI-MS gezeigt, daß die Reaktion von Peroxynitrit mit GSH nicht zur Bildung von GSNO, sondern zur Bildung von GSNO_2 führt [50]. Die Ausbeute von GSNO bzw. GSNO_2 aus dieser Reaktion ist sehr gering und beträgt etwa 1 %. Die von Mayer *et al.* gemessene erhebliche Bildung von GSNO [14] oder GSNO_2 kann daher nicht durch die Reaktion von Peroxynitrit mit GSH erklärt werden. Mayer *et al.* haben die Existenz einer Peroxynitrit-ähnlichen Spezies postuliert, die mit GSH nahezu quantitativ zu GSNO reagiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im krassen Widerspruch dazu. Es ist eher wahr-

scheinlich, daß es durch die Verwendung von HPLC-Eluenten mit niedrigem pH-Wert zur artifiziellen Bildung von GSNO aus GSH und Nitrit gekommen ist. Dieser Sachverhalt macht noch einmal sehr deutlich, welchen hohen Stellenwert Interferenz-freie analytische Methoden in der sensiblen NO-Forschung haben sollten.

6.3 Zusammenfassung, Schlußfolgerungen und Ausblick

6.3.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine selektive, Interferenz-freie und akkurate GC-MS-Methode zur Bestimmung von SNALB in Human-Plasma [59] bezüglich der Herstellung der SNALB- und S^{15} NALB-Standards und der Auswertung der GC-MS-Analysen weiterentwickelt und validiert. Mit dieser Methode wurde die Plasma-Konzentration von SNALB bei gesunden Freiwilligen und Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen und chronischem Nierenversagen gemessen. Die Konzentrationen lagen bei allen Personen um durchschnittlich 200 nM. In nur drei Plasma-Proben (von Leberkranken) von insgesamt 69 konnten gegenüber Gesunden erhöhte SNALB-Konzentrationen im Plasma gemessen werden (zweimal 1000, einmal 2000 nM).

Auch für die physiologischen niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO wurde eine Methode zur akkuraten und empfindlichen Bestimmung mittels GC-MS entwickelt und in unterschiedlichen Matrices erfolgreich eingesetzt. Diese Methode wurde unter anderem in Versuchen mit Erythrozyten, die mit SNC inkubiert wurden, zur Bestimmung der cytosolischen GSNO-Konzentration eingesetzt. Mit dieser Methode konnte physiologisch vorkommendes SNC und GSNO im Human-Plasma nicht gemessen werden.

Die GC-MS-Methoden für die Bestimmung von SNALB und von SNC und GSNO beruhen beide auf der Zersetzung der S-Nitroso-Substanzen mittels $HgCl_2$ und der Derivatisierung von Nitrit zu PFB- NO_2 . Der wesentliche Vorzug dieser GC-MS-Methoden ist die Verwendbarkeit authentischer, ^{15}N -markierter interner Standards. Um im komplexen Medium Plasmakonzentrationen von SNC und GSNO im untersten nM-Bereich akkurat quantifizieren zu können, ist eine Methode zur quantitativen Beseitigung von Blank-Nitrit notwendig. Das wäre auch für die Bestimmung von SNALB vorteilhaft, z.B. um pathogene Veränderungen der Plasma-SNALB-Konzentration gegenüber Gesunden sicher erfassen zu können.

Für die Bestimmung von GSNO wurde eine alternative Methode entwickelt, die auf der einzigartigen Reaktion von GSH mit OPA unter Bildung eines trizyklischen, UV- und Fluoreszenz-aktiven Isoindol-Derivates beruht. GSNO wird vor dieser Derivatisierungs-Reaktion zu GSH mittels 2-Mercaptoethanol umgesetzt. Die Methode wurde für die GSNO-Bestimmung im Human-Plasma bzw. für die Bestimmung von GSNO neben GSH in einer Konzentration von 5 μM optimiert. Sie sollte durch leichte Modifikationen auch für die Bestimmung von GSNO in anderen biologischen Flüssigkeiten wie dem Cytosol von Erythrozyten geeignet sein, in denen wesentlich höhere GSH-Konzentrationen vorkommen. Die Methode erlaubt eine spezifische, hoch-sensitive und Interferenz-freie Bestimmung von GSNO in physiologisch relevanten Konzentrationen, die im unteren nM-Bereich liegen. Die Methode sollte somit für weitere Untersuchungen über die Entstehung, das physiologische Vorkommen und den Metabolismus von GSNO *in vivo* hilfreich sein.

Im Plasma von Gesunden beträgt die Konzentration von SNALB ca. 200 nM und ist somit um einen Faktor von 35 kleiner als die von Stamler *et al.* berichtete Konzentration von 7 μM [6]. SNALB ist dennoch der häufigste und langlebigste NO-Träger in der Zirkulation des Menschen. Durch S-Transnitrosylierungs-Reaktionen mit Plasma-Cystein und Plasma-GSH sollten auch die niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen SNC und GSNO physiologisch im Plasma von Menschen vorkommen. Auf der Basis der ermittelten Gleichgewichtskonstanten ist jedoch mit einer Konzentration von nur ca. 2-5 nM anstatt ca. 300 nM zu rechnen, wie für Plasma-SNC berichtet wurde [64].

Der Mechanismus der S-Transnitrosylierungs-Reaktion zwischen S-Nitroso-Substanzen und Thiolen beruht auf der heterolytischen Spaltung der S-Nitroso-Gruppe. Dieser Prozeß verläuft ohne die Bildung von oxidierten Thiolen und von NO, die bei einer homolytischen Spaltung hätten entstehen müssen. Auch Hydroxylamin, das aus NO^- gebildet wird, wurde bei S-Transnitrosylierungs-Reaktionen nicht gebildet. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der S-Transnitrosylierungs-Reaktion formal eine NO^+ -Gruppe von einer S-Nitroso-Substanz auf ein Thiol übertragen wird. Diese Reaktion ist reversibel. Die in S-Transnitrosylierungs-Reaktionen am meisten bevorzugte S-Nitroso-Substanz ist SNhC ($> \text{SNAC} > \text{GSNO} \approx \text{SNALB} > \text{SNC}$). SNC ist ein starker, GSNO dagegen ein schwacher NO-Donor, wie aus entsprechenden Untersuchungen der NO-Freisetzung von S-Nitroso-Substanzen in gepufferten wäßrigen Lösungen hervorging. Die NO-Freisetzung aus SNC ist stark abhängig von der Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen und von der Cystein-Konzentration. Cu^{2+} -Ionen katalysieren, Cystein hemmt

die NO-Freisetzung aus SNC. Die hemmende Wirkung von Cystein auf die NO-Freisetzung aus SNC ist vermutlich auf die Bildung von Cu(II)-Thiolaten zurückzuführen, die aus Cystein und in den Pufferlösungen vorhandenen freien Cu^{2+} -Ionen gebildet werden.

An Albumin gebundene Cu^{2+} -Ionen können die Zersetzung von SNALB zu Nitrit in Gegenwart von Cystein beschleunigen. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß an Plasma-Proteine gebundene Cu^{2+} -Ionen die NO-Freisetzung aus SNALB auch *in vivo* regulieren könnten. Ferner hilft diese Beobachtung zu erklären, daß aus SNALB und Cystein kein SNC oder nur extrem geringe SNC-Konzentrationen entstehen. Aus Human-Plasma hergestelltes Albumin und SNALB enthalten auch gebundene Cu^{2+} -Ionen [95]. Daher könnte in der Mikroumgebung von SNALB aus SNALB und Cystein gebildetes SNC mit an SNALB gebundenem Cu^{2+} unter NO-Freisetzung reagieren.

S-Transnitrosylierungs-Reaktionen laufen auch *in vitro* und *in vivo* in Blut ab. So führte die Inkubation von Plasma und vollem Blut mit niedermolekularen S-Nitroso-Substanzen zur Bildung von SNALB. Gasförmiges NO führte hingegen nur zu einer geringfügigen, die NO-Donoren GTN und SNP zu keiner SNALB-Bildung in Plasma oder vollem Blut. Vermutlich müssen GTN und SNP zunächst metabolisiert werden, bevor sie NO freisetzen (GTN z.B. durch Konjugation mit GSH über Glutathion-S-Transferasen [174]). S-Nitroso-Substanzen werden *in vitro* in Plasma vorwiegend zu Nitrit, in vollem Blut vorwiegend zu Nitrat metabolisiert. Die Bolus-Injektion mit anschließender Langzeitinfusion von GS^{15}NO in die Ratte führte zur schnellen Bildung von S^{15}NALB und ^{15}N -Nitrit im Blut. Aus S^{15}NALB , ^{15}N -Nitrit und weiteren unbekannten Metaboliten von GS^{15}NO wurde anschließend langsam ^{15}N -Nitrat gebildet. Da die Konzentration von ^{15}N -Nitrat bei weitem größer als die von S^{15}NALB und ^{15}N -Nitrit war, könnte die Hauptmenge von ^{15}N -Nitrat über andere Wege aus GS^{15}NO entstanden sein. Anhand dieses Experiments wurde eine Halbwertszeit von S^{15}NALB *in vivo* von 23 min ermittelt.

Humane Erythrozyten besitzen ein spezifisches Transport-System für L-SNC. L-SNC wird in den Erythrozyten zu biologisch inaktivem Nitrat und biologisch aktivem GSNO metabolisiert. Alle anderen S-Nitroso-Substanzen außer L-SNC werden nicht oder in deutlich geringerem Maße in das Cytosol von humanen Erythrozyten transportiert. Das gilt selbst für das optische Isomer D-SNC. Durch das Transport-System für SNC regulieren Erythrozyten den Metabolismus von SNC und anderen S-Nitroso-Substanzen sowie deren biologische Funktionen. Die

Anwesenheit von Cystein ist essentiell für die Metabolisierung von extrazellulären, von L-SNC verschiedenen S-Nitroso-Substanzen und für die Entfaltung der biologischen Aktivität von intrazellulärem GSNO in humanen Erythrozyten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Plasma-Cystein und seine S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit anderen S-Nitroso-Substanzen zu SNC *in vivo* eine zentrale Rolle für die Regulierung, den Metabolismus und die biologischen Funktionen von S-Nitroso-Substanzen spielt.

Mit der eigens für diese Fragestellung entwickelten Methode konnte die NOS-katalysierte Bildung von GS¹⁵NO aus L-[¹⁵N₂]Arginin gezeigt werden. Die Bildung von GS¹⁵NO betrug jedoch nur etwa 2 % der ¹⁵NO-Bildung, selbst unter Bedingungen, unter denen Mayer *et al.* [14] GSNO-Konzentrationen gemessen haben, die etwa 30 % der gleichzeitig entstandenen Citrullin-Konzentration betragen. Die Ergebnisse von Schmidt *et al.*, die GSNO in Konzentrationen um 5 % der gleichzeitig entstandenen Citrullin-Menge gemessen haben [13], stimmen eher mit denen dieser Arbeit überein.

Es wurde eine Methode zur Bestimmung der Aktivität von isolierter nNOS entwickelt. Diese beruht auf der Quantifizierung von Nitrit, dem Hauptprodukt der Oxidation von NO in wäßrigen Lösungen [35], mittels GC-MS. In Gegenwart optimaler Konzentrationen aller Cofaktoren der NOS wurde für die NOS-katalysierte Reaktion von L-[¹⁵N₂]Arginin zu [¹⁵N]Nitrit eine Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt. Der mit der vorliegenden Methode ermittelte K_M-Wert betrug 3,30 (nach Hanes) bzw. 3,01 µM (nach Lineweaver-Burk) für L-[¹⁵N₂]Arginin. Die V_{max}-Werte betrugen 0,205 (nach Hanes) bzw. 0,207 µmol [¹⁵N]Nitrit · min⁻¹ · mg NOS⁻¹ (nach Lineweaver-Burk). Für ADMA, einem endogenen Inhibitor der NOS [120], konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß diese Substanz ein potenter nicht-kompetitiver Inhibitor der neuronalen NOS ist (K_i = 0,42 nach Hanes bzw. 0,32 µM nach Lineweaver-Burk, K_{ii} = 1,62 bzw. 2,18 µM für ADMA). Da ADMA unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von ca. 1 µM vorkommt, die bei verschiedenen Erkrankungen auf das Dreifache ansteigt [121,122], kann ADMA unter physiologischen und insbesondere pathophysiologischen Bedingungen eine erhebliche Rolle für die Aktivität der NOS haben.

6.3.2 Schlußfolgerungen

Auf der Basis der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und unter Einbeziehung von Erkenntnissen aus der Literatur sind die in Abb. 67 dargestellten Mechanismen für die Bildung, die Reaktionen und den Metabolismus von NO und S-Nitroso-Substanzen vorstellbar: In NO-produzierenden Zellen wie z.B. den Endothelzellen erfolgt die NOS-katalysierte Bildung von NO aus L-Arginin. Die Aktivität der NOS wird durch den endogenen NOS-Inhibitor ADMA reguliert. Da in Endothelzellen wie auch in anderen Zellen hohe intrazelluläre GSH-Konzentrationen vorliegen, entsteht durch Reaktion von GSH mit NO und/oder Peroxynitrit das GSNO. Die GSNO-Produktion beträgt etwa 5% der Nitrit-Produktion und somit etwa 2 % der gesamten NO-Produktion. Da GSNO erheblich stabiler als NO ist, findet in Endothelzellen eine Akkumulation von intrazellulärem GSNO statt, während NO schnell z.T. zu Nitrit weiterreagiert und zum Teil die Endothelzelle verläßt. Dadurch könnte in NO-produzierenden Zellen *in vivo* das Verhältnis GSNO zu NO erheblich größer werden als 2 %. GSNO könnte ein wichtiger Vermittler NO-abhängiger Signale sein. Bestimmte, noch unbekannte Faktoren könnten *in vivo* den Anteil von GSNO an den Produkten der NOS erhöhen. GSNO selbst kann das Cytosol der NO-produzierenden Zellen nicht verlassen. Es reagiert mit intrazellulärem Cystein in einer S-Transnitrosylierungs-Reaktion zu SNC. Dies wird aus dem Cytosol der NO-produzierenden Zellen heraustransportiert und gelangt in den Kreislauf oder an glatte Gefäßmuskelzellen, wo es als Vasodilatator wirkt (in Abb. 67 nicht gezeigt).

Ein Teil des intrazellulär gebildeten NO verläßt durch freie Diffusion die Zellen und gelangt über das Blut in die Erythrozyten. Dort wird der größte Teil von NO durch Oxyhämoglobin (HbO_2) zu Nitrat oxidiert und somit inaktiviert [107]. Ein kleinerer Teil des NO in den Erythrozyten reagiert zu Nitrosylhämoglobin und SNHb. Das SNHb entsteht dabei aus Nitrosylhämoglobin ($\text{Hb}[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]\text{O}_2$), indem das an Fe^{2+} gebundene NO über einen intramolekularen Transfer auf das beta-Cys-93 des Hämoglobins übertragen wird [103]. Je nachdem, ob SNHb in der oxygenierten ($\text{SNHb}[\text{Fe}^{\text{II}}]\text{O}_2$, arterielles Blut) oder desoxygenierten Form ($\text{SNHb}[\text{Fe}^{\text{II}}]$, venöses Blut) vorliegt [102], findet eine schwächere oder stärkere S-Transnitrosylierungs-Reaktion zwischen SNHb und GSH unter Bildung von GSNO in den Erythrozyten statt. Ein Teil von SNHb reagiert auch direkt mit Cystein zu SNC. Das gebildete GSNO reagiert wiederum in einer S-Transnitrosylierungs-Reaktion mit Cystein zu SNC und wird aus den Erythrozyten über ein aktives Transportsystem in das Plasma ausgeschleust. In den Erythrozyten wird GSNO über SNC direkt oder nach Freisetzung von NO durch Oxyhämoglobin zu Nitrat oxidiert.

Die Bildung von SNHb ist besonders im arteriellen Blutkreislauf begünstigt, da dort das Hämoglobin zu einem großen Anteil in der oxygenierten Form vorliegt, in der SNHb besonders stabil ist [102]. Beim Übergang des SNHb in die deoxygenierte Form in den Kapillargefäßen kommt es zu einer Destabilisierung des SNHb und zu einer GSNO-Bildung bzw. NO-Freisetzung. Auf diese Weise könnte SNHb eine zusätzliche Quelle von NO-Äquivalenten im Blutkreislauf sein und die endotheliale NO-Produktion ergänzen.

In der Plasma-Fraktion des Blutes reagiert nur ein kleiner Teil von NO mit dem Cys-34 des Albumins zu SNALB. NO wird im Plasma teilweise zu Nitrit deaktiviert. Ein Teil des Plasma-SNC und ein Teil des Plasma-Nitrits wird in die Erythrozyten transportiert, wo beide zum größeren Teil zu Nitrat oxidiert werden. Das Nitrat kann das Erythrozyten-Cytosol wieder verlassen und gelangt in das Plasma. Von dort aus wird Nitrat über die Niere ausgeschieden. Zum Teil reagiert das cytosolische SNC in den Erythrozyten mit GSH und Hb zu den entsprechenden S-Nitroso-Substanzen GSNO und SNHb [102]. Aufgrund der sehr hohen Konzentrationen von GSH und Hämoglobin in den Erythrozyten liegen die Gleichgewichte ganz auf der Seite von GSNO bzw. SNHb.

Die endogen im Plasma vorkommenden Konzentrationen von SNALB bzw. SNC und GSNO betragen etwa 200 nM bzw. 2-5 nM. Die basale *steady state*-NO-Konzentration im Plasma könnte ebenfalls im untersten nM-Bereich liegen [6].

Sämtliche S-Nitroso-Substanzen sind, sowohl intra- als auch extrazellulär, stets miteinander im Gleichgewicht und werden so ständig ineinander konvertiert. Eine besondere Stellung nimmt die Reaktion von Cystein mit SNALB ein: Aus Albumin und SNC entstehen Cystein und SNALB, während aus Cystein und SNALB kein oder kaum verfügbares SNC gebildet werden kann.

Das biologisch hochaktive SNC kann seine Wirkung stets über zwei Mechanismen entfalten: Die Freisetzung von NO und die damit verbundene cGMP-abhängige Signaltransduktion bzw. die reversible S-Transnitrosylierung von Sulfhydryl-haltigen Proteinen im Plasma, in Zellmembranen und Enzymen. Durch S-Transnitrosylierungs-Reaktionen an Proteinen kann der Transport in Membrankanälen oder die Enzymaktivität reguliert werden [64]. Über die Regulierung der SNC-Stabilität, z.B. über die Konzentration von Kupfer-Ionen, wird der Metabolismus und die biologische Aktivität sämtlicher S-Nitro-Substanzen gesteuert. Die S-Transnitrosylierung von Proteinen könnte einen ähnlichen Stellenwert haben wie die besser bekannte Protein-Phosphorylierung [64].

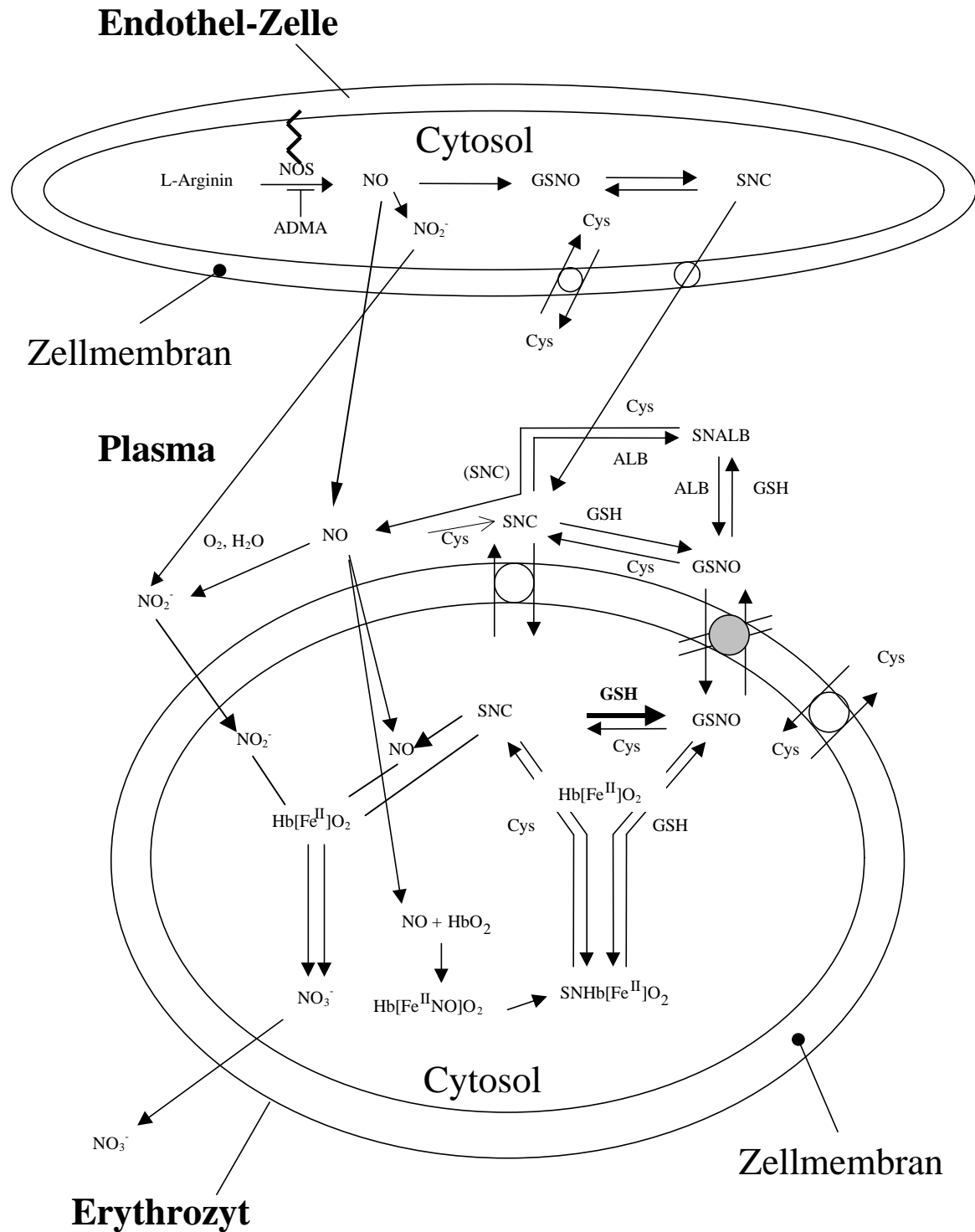


Abb. 67. Schema für die Entstehung und den Metabolismus von NO und S-Nitroso-Substanzen im Kreislauf. Pfeile in beide Richtungen zeigen Gleichgewichts-Reaktionen. Die Pfeildicken symbolisieren die Lage der Gleichgewichte. In Klammern dargestellte Substanzen symbolisieren, daß diese nicht in freier Form und nur intermediär auftreten. Offene Kreise mit Pfeilen symbolisieren ein selektives (Carrier-) Transportsystem. Ist der Kreis grau unterlegt und durchgestrichen, so existiert ein solcher Carrier nicht. Ein Pfeil, der durch eine Zellmembran gezeichnet ist, zeigt einen Transport durch Diffusion oder unbekannter Natur an. Die Zickzacklinie zwischen Zellmembran und NOS in der Endothelzelle deutet an, daß es sich bei eNOS um ein membrangebundenes Enzym handelt. Die regulatorische Funktion von ADMA auf die NOS wird durch das Zeichen T angedeutet.

In bestimmten Fällen können auch exogene Verbindungen einen Einfluß auf die Eigenschaften von S-Nitroso-Substanzen nehmen. Ascorbinsäure aus der Nahrung ist eine solche Verbindung, die die NO-Freisetzung aus SNALB und GSNO zu regulieren vermag, allerdings nicht über S-Transnitrosylierungs-Reaktionen, sondern möglicherweise über die Reduktion der Nitrosyl-Gruppe dieser Verbindungen zu NO [179] (in Abb. 67 nicht gezeigt).

6.3.3 Ausblick

Die oben geschilderten Vorstellungen zu den Mechanismen der Bildung von NO und der physiologischen S-Nitroso-Substanzen GSNO, SNC, SNALB und SNHb und deren Metabolismus sowie der Entfaltung ihrer biologischen Aktivitäten beruhen z.T. auf gesicherten Erkenntnissen, z.T. aber auch auf Annahmen, deren Gültigkeit durch weitere Untersuchungen noch zu beweisen ist. Auch ist dieses Bild nicht vollständig und sollte ebenfalls durch weitergehende Untersuchungen ergänzt werden. Die komplette, lückenlose und korrekte Zusammensetzung dieses schwierigen Puzzles wird helfen, nicht nur die biologischen Funktionen von NO und seiner zahlreichen Metabolite besser verstehen zu können, sondern auch auf die zugrundeliegenden, komplexen Prozesse gezielt Einfluß zu nehmen und diese zum Wohle des Menschen zu lenken.

Zur Vervollständigung des Bildes könnten Untersuchungen zu folgenden Fragestellungen beitragen:

Zunächst sei nochmal betont, daß für die Realisierung dieser Vorhaben akkurate, Interferenzfreie und hochsensitive analytische Methoden unabdingbar notwendig sind. Die Weiterentwicklung der vorhandenen GC-MS-Methoden könnte hier hilfreich sein.

Insbesondere hat sich Nitrit als die größte Interferenz in allen GC-MS-Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Substanzen erwiesen. Die vollständige und spezifische Beseitigung von Nitrit würde helfen, pathophysiologische Zustände zu erkennen, die durch veränderte Bildung dieser Substanzen gekennzeichnet sind, um diese dann durch therapeutische Maßnahmen zu korrigieren.

Die NOS-katalysierte Bildung von Superoxid, Peroxynitrit sowie von GSNO und GSNO₂ sollte detailliert untersucht und die Parameter, die sie beeinflussen können, bestimmt werden. Man könnte z.B. untersuchen, welchen Einfluß ADMA auf die Bildung dieser Substanzen hat.

Untersuchungen sollten auch darauf abzielen, das Transportsystem für SNC in humanen Erythrozyten vollständig zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich untersucht werden, ob ähnliche Transportsysteme auch in der Zellmembran anderer Zellen wie z.B. Endothelzellen, Thrombozyten und Nervenzellen existieren.

SNALB ist die häufigste physiologische S-Nitroso-Substanz in der Zirkulation des Menschen, die nicht nur Träger von NO ist, sondern auch im Zusammenspiel mit Plasma-Cystein für die Regulation verschiedener NO-abhängiger biologischer Funktionen verantwortlich ist. Der zugrundeliegende Mechanismus und die Bedeutung von Kupfer-Ionen in diesem Prozeß sind weiter aufzuklären.

Thionitrate wie GSNO₂ sind von Thionitriten (S-Nitroso-Substanzen) nur schwer unterscheidbar. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führten zu dem Ergebnis, daß GSNO₂ instabiler als GSNO ist und in Abwesenheit von Hg²⁺-Ionen z.T. zu Nitrat reagiert. Die mögliche Bildung von Thionitraten *in vivo* und ihre biologischen Eigenschaften sollten weiter untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine., *Nature*, (1980), 5789, 373-376.
- [2] Rapoport, R.M., Draznin, M.B., Murad, F., Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent proteinphosphorylation., *Nature*, (1983), 306, 174-176.
- [3] Ignarro, L.J., Harbison, R.G., Wood, K.S., Kadowitz, P.J., Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1986), 237, 893-900.
- [4] Ignarro, L., Byrnes, R., Buga, G., Wood, K., Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical., *Clin. Res.*, (1987), 61, 866-879.
- [5] Ignarro L., Lipton, H., Edwards, J., Baricos, W., Hyman, A., Kadowitz, P., Gruetter, C., Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1981), 218, 739-749.
- [6] Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C., Loscalzo, J., Nitric oxide circulates in mammalian Plasma primarily as a S-nitroso adduct of serum albumin., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1992), 89, 7674-7677.
- [7] Scharfstein, J.S., Keaney, F., Jr., Slivka, A., Welch, G.N., Vita, J.A., Stamler, J.S., Loscalzo, J., In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols., *J. Clin. Invest.*, (1994), 94, 1432-1439.
- [8] Radomski, M.W., Palmer, R.M. J., Moncada, S., Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets., *Br. J. Pharmacol.*, (1987), 92, 181-187.
- [9] Radomski, M.W., Palmer, R. M. J., Moncada, S., The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide., *Br. J. Pharmacol.*, (1987), 92, 639-646.
- [10] Rubanyi, G.M., Endothelium-derived relaxing and contracting factors., *J. Cell. Biochem.*, (1991), 46, 27-36.
- [11] Knowles, R.G., Moncada, S., Nitric oxide synthases in mammals., *Biochem. J.*, (1994), 298, 249-258.
- [12] Malinski, T., Radomski, M.W., Taha, Z., Moncada, S., Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1993), 194, 960-965.

-
- [13] Schmidt, H.H., Hofmann, H., Schiendler, U., Shufenko, Z.S., Cunningham, D.D., Feelisch, M., No $\text{NO}^{\cdot-}$ from NO synthase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997), 93, 14492-14497.
- [14] Mayer, B., Pfeiffer, S., Schrammel, A., Koesling, D, Schmidt, K., Brunner, F., A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione., *J. Biol. Chem.*, (1998), 273, 3264-3270.
- [15] Kowaluk, E. A., Fung, H.L., Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1990), 255 1256-1264.
- [16] Arnette, D., Stamler, J.S., NO^+ , $\text{NO}^{\cdot-}$ and NO^- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1995), 318, 279-285.
- [17] Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J., S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1992), 89, 444-448.
- [18] Fontecave, M., Pierre, J.L., The basic chemistry of nitric oxide and its possible biological reactions., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1994), 131, 620-631.
- [19] Williams, D.L.H., Nitrosation, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, (1988), 173-180.
- [20] Barrett, J., Fitzgibbons, L.J., Glauser, J., Still, R. H., Young, P.N.W., Photochemistry of the S-Nitroso Derivatives of Hexane-1-thiol and Hexane-1,6-dithiol., *Nature*, (1966), 211, 848.
- [21] Reinboldt, H., Mott, F., Über die thermische Dissoziation der Alkyl-thionitrite., *J. Prakt. Chem.*, (1932), 133, 328-332.
- [22] McAninly, J., Williams, D. L. H., Askew, S. C., Butler, A. R., Russell, C., Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1993), 23, 1758-1759.
- [23] Dicks, A. P., Swift, H. R., Williams, D.L.H., Butler, A.R., Al-Sadoni, H.H., Cox, B.G., Identification of Cu^+ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO)., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1996), 4, 481-487.
- [24] Gordge, M.P., Meyer, D. J., Hothersall, J., Neild, G.H., Payne, N.N., Noronha-Dutra, A., Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols., *Br. J. Pharmacol.*, (1995), 114, 1083-1089.
- [25] Gordge, M.P., Hothersall, J., Neild, G.H., Dutra, A.A.N., Role of copper (I)-dependent enzyme in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione., *Br. Pharmacol. J.*, (1996), 119, 533-538.

-
- [26] Dicks, A.P., and Williams, D.L.H., Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu^{2+} sources., *Chem. Biol.*, (1996), 3, 655–659.
- [27] Field, L., Dilts, R.V., Ravichandran, R., Lenhert, P. G., and Carnahan, G. E., An unusually stable thionitrite from N-Acetyl-D,L-penicillamine; x-ray crystal and molecular structure of 2-(Acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite., *J.C.S. Chem. Commun.*, (1978), 249-250.
- [28] Hart, T. W., Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione., *Tetrahedron Lett.*, (1985), 26, 2013-2016.
- [29] Bainbrigge, N., Butler, A. R., Görbitz, C. H., The thermal stability of S-nitrosothiols: experimental studies and ab initio calculations on model compounds., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1997), 2, 351-353.
- [30] Meyer, D. J., Kramer, H., Özer, N., Coles, B., Ketterer, B., Kinetics and equilibria of S-nitrosothiol-thiol exchange between glutathione, cysteine, penicillamines and serum albumin. *FEBS Lett.*, (1994), 345, 177-180.
- [31] Zhang, H., Means, G.E., S-nitrosation of serum albumin: spectrophotometric determination of its nitrosation by simple S-nitrosothiols., *Anal. Biochem.*, (1996), 237, 141-144.
- [32] Studebaker, M.S., Zhang, H., Means, G.E., 5-Nitrosothio-2-nitrobenzoate: a reagent for the nitrosation of thiol groups in proteins., *Anal. Biochem.*, (1996), 237, 193-197.
- [33] Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J., Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms., *Science*, (1992), 258, 1898-1902.
- [34] Vanin, A.F., Malenkova, I.V., Serezhenkov, V.A., Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies., *Nitric Oxide*, (1997), 1, 191-203.
- [35] Wink, D., Darbyshire, J., Mims, R., Savadra, J., Ford, P., Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediaries generated in the NO/O_2 reaction., *Chem. Res. Toxicol.*, (1993), 6, 17-23.
- [36] Liu, X., Miller, M., Joshi, M., Thomas, D., Lancaster Jr., J., Accelerated reaction of nitric oxide with O_2 within the hydrophobic interior of biological membranes., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1998), 95, 2175-2179.
- [37] Haddad, I.Y., Crow, J.P., Hu, P., Ye, Y., Beckmann, J., Matalon, S., Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A., *Am. J. Physiol.*, (1994), 267, L242-L249.
- [38] Wink, D.A., Kadprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S., Keefer, L.K., DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors., *Science*, (1991), 254, 1001-1003.

-
- [39] Gow, A., Buerk, D., Ischiropoulos, H., A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo., *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, 2841-2845.
- [40] Simon, D.I., Mullins, M.E., Jia, L., Gaston, B., Singel, D.J., Stamler, J.S., Polynitrosylated proteins: characterisation, bioactivity and functional consequences., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1996), 93, 4736-4741.
- [41] Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., Beckmann, J.S., Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1992), 298, 431-437.
- [42] Uppu, R.M., Squadrito, G.L., Pryor, W.A., Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1996), 327, 335-343.
- [43] Tsikas, D., Gutzki, F.-M., Rossa, S., Bauer, H., Neumann, Ch., Dockendorff, K., Sandmann, J., Frölich, J.C., Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess Assay: problems with the Griess Assay-solutions by gas chromatography-mass spectrometry., *Anal. Biochem.*, (1997), 244, 208-220.
- [44] Tsikas, D., Sandmann, J., Ikic, M., Fauler, J., Stichtenoth, D.O., Frölich, J.C., Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine., *J. Chromatogr. B*, (1998), 708, 55-60.
- [45] Zafiriou, O.C., and McFarland, M., Determination of trace levels of nitric oxide in aqueous solution., *Anal. Chem.*, (1980), 52, 1662-1667.
- [46] Stamler, J.S., Loscalzo, J., Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives., *Anal. Chem.*, (1992), 64, 779-785.
- [47] Tsikas, D., Ikic, M., Tewes, K.S., Raida, M., and Frölich, J.C., Inhibition of platelet aggregation by S-nitroso-cysteine via cGMP-independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A2 synthesis in human blood platelets., *FEBS Lett.*, (1999), 442, 162-166.
- [48] Rossa, C.S., Chemie, Biochemie und Pharmakologie von S-Nitroso-Substanzen und S-Nitroso-Albumin: Entwicklung analytischer Methoden und deren Anwendung zur Aufklärung der Mechanismen der Bildung, des Metabolismus und der biologischen Wirkung von S-Nitroso-Substanzen., Dissertation, Hannover, (1997).
- [49] Kluge, I., Gutteck-Amsler, U., Zollinger, M., and Quang Do, K., S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry., *J. Neurochem.*, (1997), 69, 2599-2607.
- [50] Balazy, M., Kaminski, P.M., Mao, K., Tan, J., Wolin, M.S., S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide., *J. Biol. Chem.* (1998), 273, 32009-32015.

-
- [51] Shibuki, K., An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue., *Neurosci. Res.*, (1990), 9, 69-76.
- [52] Malinski, T., and Taha, Z., Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor., *Nature*, (1992), 358, 676-678.
- [53] Pfeiffer, S., Schrammel, A., Schmidt, K., Mayer, B., Electrochemical determination of S-nitrosothiols with a Clark-type nitric oxide electrode., *Anal. Biochem.*, (1998), 258, 68-73.
- [54] Rabini, R.A., Staffolani, R., Fumelli, P., Mutus, B., Curatola, G., Mazzanti, L., Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients., *Diabetologia*, (1998), 41, 101-104.
- [55] Gustafsson, L.E., Leone, A.M., Persson, M.G., Wiklund, N.P., Moncada, S., Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1991), 181, 852-857.
- [56] Griess, P., *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, (1879), 12, 426-428.
- [57] Saville, B., A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols., *Analyst*, (1958), 83, 670-672.
- [58] Tsikas, D., Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C., Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labelled analogs., *J. Chromatogr. B*, (1994), 661, 185-191.
- [59] Sandmann, J., Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung von S-Nitroso-Albumin im Humanplasma und deren Anwendung bei gesunden Probanden, bei intravenöser Infusion von L-Arginin und nach intravenöser Injektion von S-Nitroso-L-Cystein bei Ratten., Diplomarbeit, Hannover, (1997).
- [60] Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. I. Preparation, purification, isolation, characterization and metabolism of S-[¹⁵N]nitrosoalbumin in human blood in vitro., *J. Chromatogr. B*, (1999), 726, 1-12.
- [61] Tsikas, D., Sandmann, J., Gutzki, F.M., Stichtenoth D.O., Frölich, J.C., Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. II. Quantitative determination of S-nitrosoalbumin in human plasma using S-[¹⁵N]nitrosoalbumin as internal standard., *J. Chromatogr. B*, (1999), 726, 13-24.
- [62] Tesch, J.W., Rehg, W.R., and Sievers, R.E., Microdetermination of nitrates and nitrites in saliva, blood, water, and suspended particulates in air by gas chromatography., *J. Chromatogr.*, (1976), 126, 743-755.
- [63] Green, L.C., Ruiz de Liuzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R., Nitrate biosynthesis in man., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981), 78, 7764-7768.

-
- [64] Butler, A.R., Rhodes, P., Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols., *Anal. Biochem.*, (1997), 249, 1-9.
- [65] Tsikas, D., Sandmann, J., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C., Interference by S-nitroso compounds with the measurement of nitrate in methods requiring reduction of nitrate to nitrite by cadmium., *J. Chromatogr. B*, (1999), 729, 375-378.
- [66] Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Gas chromatographic-mass spectrometric detection of S-nitroso-cysteine and S-nitroso-glutathione., *Anal. Biochem.* (1999), 272, 117-122.
- [67] Rhodes, P., Leone, A.M., Francis, P.L., Struthers, A.D., Moncada, S., The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1995), 209, 590-596.
- [68] Neuschwander-Tetri, B.A., Roll, F.J., Glutathione measurement by high-performance liquid chromatography separation and fluorometric detection of the glutathione-orthophthalaldehyde adduct., *Anal. Biochem.*, (1989), 179, 236-241.
- [69] Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Meyers, C.B., Ohlstein, E.H., Ballot, B.A., Hyman, A.L., and Kadowitz, P.J., Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation., *Mol. Pharmacol.*, (1983), 23, 653-660.
- [70] Moynihan, H.A., Roberts, S.M., Preparations of some novel S-nitroso compounds as potential slow release agents of nitric oxide in vivo., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (1994), 7, 797-805.
- [71] MacAllister, R.J., Calver, A.L., Riezebos, J., Collier, J., Vallance, P., Relative potency and arteriovenous selectivity of nitrovasodilators on human blood vessels: an insight into the targeting of nitric oxide delivery., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1995), 273, 154-160.
- [72] Mathews, W.R., and Kerr, S.W., Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1993), 267, 1529-1537.
- [73] Gaston, B., Drazen, J.M., Jansen, A., Sugarbaker, D.A., Loscalzo, J., Richards, W., Stamler, J.S., Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1994), 268, 978-984.
- [74] Bauer, J.A., and Fung, H.-L., Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1991), 256, 249-254.
- [75] Horowitz, J.D., Antman, E.N., Lorell, B.H., Barry, W.H., and Smith, T.W., Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine., *Circulation*, (1993), 68, 1247-1253.
- [76] Boesgaard, S., Thiol compounds and organic nitrates., *Dan. Med. Bull.* (1995), 42, 473-84.

-
- [77] Radomski, M.W., Rees, D.D., Dutra, A., and Moncada, S., S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo., *Br. J. Pharmacol.*, (1992), 107, 745-749.
- [78] Askew, S.C., Butler, A.R., Flitney, F.W., Kemp, G.D., Megson, I. L., Chemical mechanisms underlying the vasodilator and platelet anti-aggregating properties of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and S-nitrosoglutathione., *Bioorg. Med. Chem.*, (1995), 3, 1-9.
- [79] Lieberman, E. H., O'Neill, S., and Mendelsohn, M., S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels., *Circ. Res.*, (1991), 68, 1722-1728.
- [80] Mendelsohn, M. E., O'Neill, S., George, D., and Loscalzo, J., Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine., *J. Biol. Chem.*, (1990), 265, 19028-19034.
- [81] Naseem, K.M., Chirico, S., Mohammadi, B., Bruckdorfer, K.R., The synergism of hydrogen peroxide with plasma S-nitrosothiols in the inhibition of platelet activation., *Biochem. J.*, (1996), 318, 759-766.
- [82] Brunner, F., Stessel, H., Kukovetz, W.R., Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion., *FEBS Lett.*, (1995), 376, 262-266.
- [83] Pepke-Zaba, J., Higenbottam, T.W., Dinh-Xuan, A.T., Stone, D., and Wallwork, J., Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension., *Lancet*, (1991), 338, 1173-1174.
- [84] Gaston, B., Sears, S., Woods, J., Hunt, J., Ponaman, M., McMahon, T., Stamler, J.S., Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure., *Lancet*, (1998), 351, 1317-1319.
- [85] Park, J. W., Attenuation of p47^{phox} membrane translocation as a inhibitory mechanism of S-nitrosothiol on the respiratory burst oxidase in human neutrophils., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1996), 220, 31-35.
- [86] Peng, H. B., Libby, P., Liao, J.K., Induction and stabilization of I κ B α by nitric oxide mediates inhibition of NF κ B., *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 14214-14219.
- [87] Clancy, R., Levartowsky, D., Leszczynska-Piziak, J., Yegudin, J., Abramson, S., Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphat shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (1994), 91, 3680-3684.
- [88] Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N., Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide., *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 21035-21039.

-
- [89] Asahi, M., Fujii, J., Takao, T., Kuzuya, T., Hori, M., Shimonishi, Y., Taniguchi, N., The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor., *J. Biol. Chem.*, (1997), 272, 19152-19157.
- [90] Becker, K., Gui, M., Schirmer, R.H., Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione., *Eur. J. Biochem.*, (1995), 234, 472-478.
- [91] Clark, A. G., Degnam, P., Inhibition of glutathione S-transferases from fat liver by S-nitroso-L-glutathione., *Biochem. Pharmacol.*, (1988), 37, 3199-3201.
- [92] Han J., Stamler, J.S., Li, H.-L., Griffith, O., Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by S-nitrosylation., in: J.S. Stamler, S.Gross, S. Moncada, A. Higgs (Eds.), *Biology of Nitric Oxide (IV)*, Portland Press, London, (1996), S.114.
- [93] Kelm, M., Schrader, J., Control of coronary vascular tone by nitric oxide., *Circ. Res.*, (1990), 66, 1561-1575.
- [94] Minamiyama, Y., Takemura, S., Inoue, M., Albumin is an important vascular tonus regulator as a reservoir of nitric oxide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1996), 225, 112-115.
- [95] Peters Jr., T., Serum Albumin, *Advances in Protein Chemistry.*, Academic Press. Inc. (1995), 37
- [96] Mansoor, M.A., Svardal, A.M., Ueland, P.M., Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma., *Anal. Biochem.*, (1992), 200, 218-229.
- [97] Morris, S., Walsh, R., Hansen, J., Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action., *J. Biol. Chem.*, (1984), 259, 1350-13594.
- [98] DeGroote, M., Testerman, T., Xu, Y., Stauffer, G., Fang, F., Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*., *Science*, (1996), 272, 414-417.
- [99] Ho, Y.S., Liu, H.L., Duh, J.S., Chen, R.J., Ho, W.L., Jeng, J.H., Wang, Y.J., Lin, J.K., Induction of apoptosis by S-nitrosoglutathione and Cu^{2+} or Ni^{2+} ion through modulation of bax, bad, and bcl-2 proteins in human colon adenocarcinoma cells., *Mol. Carcinog.*, (1999), 26, 201-211.
- [100] Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J. M., Fackler, J., Ramden, P., Arnette, D., Mullins, M.E., Sugarbaker, D., Chee, C., Singel, D., Loscalzo, J., Stamler, J.S., Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1993), 90, 10957-10961.
- [101] Do, K., Benz, B., Grima, G., Guetteck-Amsler, U., Kluge, I., Salt, T., Nitric oxide Precursor arginine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function., *Neurochem. Int.*, (1996), 29, 213-224.

-
- [102] Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J.S., S-Nitrosohemoglobine: a dynamic activity of blood involved in vascular control., *Nature*, (1996), 380, 221-226.
- [103] Gow, A.J., Stamler, J.S., Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions., *Nature*, (1998), 391, 169-173.
- [104] Lancaster, J.R., Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1994), 91, 8137-8141.
- [105] Myers P.R., Minor R.L. Jr, Guerra R Jr, Bates J.N., Harrison D.G., Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide., *Nature*, (1990), 345, 161-163.
- [106] Barnett, D.J., Rios, A., and Williams, D.L.H., NO-group transfer (transnitrosation) between S-nitrosothiols and thiols., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1995), 7, 1279-1282.
- [107] Wennmalm, Å, Benthin, G., Petersson, A.-S., Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin., *Br. J. Pharmacol.*, (1992), 106, 507-508.
- [108] Meister, A., Anderson, M.E., Glutathione., *Annu. Rev. Biochem.*, (1983), 52, 711-760.
- [109] Raman, C.S., Li, H., Martásek, P., Král, v., Masters, B.S.S., Poulos, T.L., Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center., *Cell*, (1998), 95, 939-950.
- [110] Marletta, M., Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis., *Cell*, (1994), 78, 927-930.
- [111] Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L., Wiseman, J., N^ω-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine., *J. Biol. Chem.*, (1991), 266, 6259-6263.
- [112] Hecker, M., Boese, M., Schini-Kerth, V.B., Mülsch, A., Busse, R., Characterization of the stable L-arginine-derived relaxing factor released from cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells as an N^G-hydroxyl-L-arginine-nitric oxide adduct., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), 92, 4671-4675.
- [113] Griffith, O.W., Stuehr, D.J., Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms., *Annu. Rev. Physiol.*, (1995), 57, 707-736.
- [114] Masters, B.B.S., McMillan, K., Sheta, E.A., Nishimura, J.S., Roman, L.J., Martásek, P., Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal., *FASEB J.*, (1996), 10, 552-558.
- [115] Nathan, C., Natural resistance and nitric oxide., *Cell*, (1995), 82, 873-876.

-
- [116] Nathan. C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells., *FASEB J.*, (1992), 6, 3051-3064.
- [117] Huang, Z., Huang, P.L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M. C., Moskowitz, M.A., Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase., *Science*, (1994), 265, 1883-1885.
- [118] Stichtenoth, D.O., Fauler, J., Zeidler, H., Frölich, J.C., Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone., *Ann. Rheum. Dis.*, (1995), 54, 820-824.
- [119] Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Phivthong-Ngam, L., Brandes, R.P., Schwedhelm, E., Mügge, A., Böhme, M., Tsikas, D., Frölich, J.C., Dietary L-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms., *Atherosclerosis*, (1998), 141, 31-43.
- [120] Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collierr, J., Moncada, S., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure., *Lancet*, (1992), 339, 572-575.
- [121] Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Boeger, R.H., Bode-Böger, S.M., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., Dubiel, J.S., Frölich, J.C., Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (1999), 33, 652-658.
- [122] Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K., Frölich, J.C., Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease., *Circulation*, (1997), 95, 2068-2074.
- [123] Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., Murad, F., Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991), 88, 10480-10484.
- [124] Kwon, N.S., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages, *J. Biol. Chem.*, (1989), 264, 20496-20501.
- [125] Tayeh, M.A., Marletta, M.A., Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor., *J. Biol. Chem.*, (1989), 264, 19654-19658.
- [126] Kaufman, S., Tetrahydrobiopterin: basic biochemistry and role in human disease., Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, (1997).
- [127] Hemmens, B., Mayer, B., Enzymology of nitric oxide synthases., *Methods Mol. Biol.*, (1997), 100, 1-32.

-
- [128] Gorren, A.C.F., Schrammel, A., Schmidt, K., Mayer, B., Thiols and neuronal nitric oxide synthase: complex formation, competitive inhibition, and enzyme stabilization., *Biochemistry*, (1997), 36, 4360-4366.
- [129] Moro, M.A., Darley-USmar, V.M., Goodwin, D.A., Read, N.G., Zamorapino, R., Feelish, M., Radomski, M.W., Moncada, S., Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets., *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, (1994), 91, 6702-6706.
- [130] Mayer, B., Schrammel, A., Klatt, P., Koesling, D., Schmidt, K., Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation., *J. Biol. Chem.*, (1995), 270, 17355-17360.
- [131] Tagliente, T.M., Craddock, Royal, B., Beasley, J., Maayani, S., A modified citrulline assay of NOS activity in rat brain homogenates does not detect direct effects of halothane on the kinetics of NOS activity., *Brain. Res.*, (1997), 767, 393-396.
- [132] Qiang, W., Liu, J., Lu, F., Measurement of NOS activity by monitoring the conversion of ^3H -arginine., *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*, (1996), 76, 567-571.
- [133] Carlberg, M., Assay of neuronal nitric oxide synthase by HPLC determination of citrulline., *J. Neurosci. Methods.*, (1994), 52, 165-167.
- [134] Whorton, A.R., Simonds, D.B., Piantadosi, C.A., Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells., *Am. J. Physiol.*, (1997), 272, 1161-1166.
- [135] Mehdizadeh, S., O'Farrell, A., Bitensky, L., Weisz, J., Alagband-Zadeh, J., Chayen, J., Measurement of nitric oxide synthase activity in sections of rat liver., *J. Histochem. Cytochem.*, (1995), 43, 1229-1233.
- [136] Wang, W., Inoue, N., Nakayama, T., Ishii, M., Kato, T., An assay method for nitric oxide synthase in crude samples by determining product NADP., *Anal. Biochem.*, (1995), 227, 274-280.
- [137] Meyer, J., Richter, N., Hecker, M., High-Performance Liquid Chromatographic Determination of nitric oxide synthase-related Arginine derivatives in vitro and in vivo., *Anal. Biochem.*, (1997), 247, 11-16.
- [138] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, (1976), 72, 248-254
- [139] Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1959), 82, 70-77.
- [140] Zak, B., Simple procedure for the single sample determination of serum copper and iron., *Clin. Chim. Acta*, (1958), 3, 328-334.
- [141] Born, C.V.R., Cross, M.J., The aggregation of blood platelets., *J. Physiol. (London)*, (1963), 168, 178-195.

-
- [142] Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C., Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry., *Anal. Biochem.*, (1999), 270, 231-241.
- [143] Ueland, P.M., and Refsum, H., Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy., *J. Lab. Clin. Med.*, (1989), 114, 473-501.
- [144] Wong, P.S.Y., Hyun, J., Fukuto, J.M., Shirota, F.N., DeMaster, E.G., Shoeman, D.W., Nagasawa, H.T., Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry., *Biochemistry*, (1998), 37, 5362-5371.
- [145] Hughes, M.N., Cammack, R., Synthesis, chemistry, and applications of nitroxyl ion releasers sodium trioxodinitrate or Angeli's salt and Piloty's acid., *Methods Enzymol.*, (1999), 301, 279-287.
- [146] Tewes, K.S., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [147] Savva, A., Lueßen, P., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [148] Delvin, J., Palmer, R.M.J., Gonde, C.E., O'Grady, J., Heaton, N., Tan, K.C., Martin, J.F., Moncada, S., Williams, R., Nitric oxide generation. A predictive parameter of acute allograft rejection., *Transplantation*, (1994), 58, 592-595.
- [149] Gaston, B., Nitric oxide and thiol groups., *Biochim. Biophys. Acta*, (1999), 1411, 323-333.
- [150] Tsikas, D., Rossa, S., Stichtenoth, D.O., Raida, M., Gutzki, F.-M., Frölich, J.C., Is S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine a circulating or an excretory metabolite of nitric oxide (NO) in man? Assessment by gas chromatography-mass spectrometry., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1996), 220, 939-944.
- [151] Tsikas, D., Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Brunner, G., Frölich, J.C., Formation of S-nitroso compounds from sodium nitroprusside, nitric oxide or nitrite and reduced thiols: analysis by capillary isotachopheresis., *J. Chromatogr. A*, (1995), 699, 363-369.
- [152] DeMaster, E.G., Quast, B.J., Redfern, B., Nagasawa, H.T., Reaction of nitric oxide with the free sulfhydryl group of human serum albumin yields a sulfenic acid and nitrous oxide., *Biochemistry*, (1995), 34, 11494-11499.
- [153] Ewing, J.F., Young, D.V., Janero, D.R., Garvey, D.S., Grinell, T.A., Nitrosylated bovine serum albumin derivatives as pharmacologically active nitric oxide congeners., *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, (1997), 283, 947-954.
- [154] Park, J.K.J., and Kostka, P., Fluorometric detection of biological S-nitrosothiols., *Anal. Biochem.*, (1997), 249, 61-66.
- [155] Sonoda, M., Kobayashi, J., Takezawa, M., Miyazaki, T., Nakajima, T., Shimomura, H., Koike, K., Satomi, A., Ogino, H., Omoto, R., Komoda, T., An assay method for nitric oxide-related compounds in whole blood., *Anal. Biochem.*, (1997), 247, 417-427.

-
- [156] Roth, M., Fluorescence reaction for amino acids., *Anal. Chem.*, (1971), 43, 880-882.
- [157] Simons, S.S., and Johnson, D.F., The structure of fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines., *J. Am. Chem. Soc.*, (1976), 98, 7098-7099.
- [158] Brecht, D.S., Snyder, S.S., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme., *Proc. Natl. Sci. USA*, (1990), 87, 682-685.
- [159] Klatt, P., Schmidt, K., Uray, G., Mayer, B., Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase., *J. Biol. Chem.*, (1993), 268, 14781-14787.
- [160] Furfine, E.S., Harmon, M.F., Paith, J.E., Garvey, E.P., Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-N^G-nitroarginine., *Biochemistry*, (1993), 32, 8512-8517.
- [161] Klatt, P., Schmidt, K., Brunner, F., Mayer, B., Inhibitors of brain nitric oxide synthase., *J. Biol. Chem.*, (1994), 269, 1674-1680.
- [162] Furfine, E.S., Carbine, K., Bunker, S., Tanouri, G., Harmon, M., Laubach, V., Sherman, P., Potent inhibition of human neuronal nitric oxide synthase by N^G-nitro-L-arginine methylester results from contaminating N^G-nitro-L-arginine., *Life Sciences*, (1997), 60, 1803-1809.
- [163] Bode-Böger, S.M., Böger, R.H., Löffler, M., Tsikas, D., Brabant, G., Frölich, J.C., L-arginine stimulates NO-dependent vasodilation in healthy humans - effect of somatostatin pretreatment., *J. Invest. Med.*, (1999), 47, 43-50.
- [164] Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F., Mayer, B., Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine., *Br. J. Pharmacol.*, (1996), 118, 1433-1440.
- [165] Hibbs Jr., J.B., Westenfelder, C., Taintor, R., Vavrin, Z., Kablitz, C., Baranowski, R.L., Ward, J.H., Nenlove, R.L., McMurphy, M.P., Kushner, J.P., Samlowski, W.E., Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2-therapy., *J. Clin. Invest.*, (1992), 89, 867-877.
- [166] Liu, Z., Rudd, M. A., Freedman, J.E., Loscalzo, J., S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1998), 284, 526-534.
- [167] Olsson, B., Johansson, M., Gabrielsson, J., Bolme, P., Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, (1988), 34, 77-82.
- [168] Tsikas, D., Ikic, M., Rossa, S., Sandmann, J., Tewes, K.S., Frölich, J.C., Inhibition of human blood platelet aggregation in vitro by S-nitrosocysteine and S-nitrosoalbumin via cGMP-dependent and cGMP-independent mechanisms., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, (1999), 55, A27, S. 99.

-
- [169] Padgett, C.M., and Whorton, A.R., S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation., *Am J. Physiol.*, (1995), 269, C739-C749.
- [170] Keaney Jr., J.F., Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O., Scharfstein, J., Vita, J.A., Loscalzo, J., NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties., *J. Clin. Invest.*, (1993), 91, 1582-1589.
- [171] Yeates, R.A., Laufen, H., Leithold, M., The reaction between organic nitrates and sulfhydryl compounds. A possible model system for the activation of organic nitrates., *Molecular Pharmacol.*, (1985), 28, 555-559.
- [172] Loscalzo, J., N-Acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin., *J. Clin. Invest.*, (1985), 76, 703-708.
- [173] Chong, S., Fung, H.-L., Thiol-mediated catalysis of nitroglycerin degradation by serum proteins. Increase in metabolism was not accompanied by S-nitrosothiol production., *Drug. Metabol. Dispos.*, (1990), 18, 61-67.
- [174] Chen, L.Y., Mehta, P., Mehta, L.J., Platelet inhibitory effect of nitroglycerin in platelet-rich plasma: relevance of glutathione-S-transferases in plasma., *J. Invest. Med.*, (1996), 44, 561-565.
- [175] Lau, S.J., Kruck, T.P.A., Sarkar, B., A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin., *J. Biol. Chem.*, (1974), 249, 5878-5884.
- [176] Sase, K., Michel, T., Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets., *Life Sci.*, (1995), 57, 2049-2055.
- [177] Hofmann, H., Schmidt, H.H., Thiol dependence of nitric oxide synthase., *Biochemistry*, (1995), 34, 13443-13452.
- [178] Pryor, W.A., Squadrito, G.L., The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide., *Am. J. Physiol.*, (1995), 268, L699-722.
- [179] Scorza, G., Pietraforte, D., Minetti, M., Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma., *Free Radic. Biol. Med.*, (1997), 22, 633-642.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ϵ	Extinktionskoeffizient
2ME	2-Mercaptoethanol
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
ALB	Albumin
BSA	bovines Serum Albumin
CaM	Calmodulin
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	<i>counts per minute</i>
Cu-ALB	mit Cu ²⁺ behandeltes Albumin
Cu-SNALB	mit Cu ²⁺ behandeltes S-Nitroso-Albumin
Cys	Cystein
D-SNC	D-S-Nitrosocystein
DTNB	Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3-dicarbonsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiotreitol
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinadeninmononucleotid
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	Reduziertes Glutathion
GSNO	S-Nitroso-Glutathion
GSNO ₂	S-Nitro-Glutathion
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
GTN	Glyceryltrinitrat
H ₄ Bip	Tetrahydrobiopterin
Hb[Fe ^{II}]	deoxy-Konformation des Hämoglobins
Hb[Fe ^{II}]O ₂	oxy-Konformation des Hämoglobins
hCys	Homocystein
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSA	Human-Serumalbumin
I.D.	Innendurchmesser
I.S.	interner Standard
iNOS	induzierbare NO-Synthase
k	Geschwindigkeitskonstante
K _{eq}	Gleichgewichtskonstante
KG	Körpergewicht

L-NAME	<i>N</i> ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NMA	<i>N</i> ^G - Methyl-L-Arginin
L-NNA	<i>N</i> ^G -Nitro-L-Arginin
L-NNA	<i>N</i> ^G -Nitro-L-Arginin
L-SNC	L-S-Nitrosocystein
LOD	<i>limit of quantitation</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAC	<i>N</i> -Acetyl-L-cystein
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NAP	<i>N</i> -Acetyl-DL-penicillamin
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimid
NH ₂ OH	Hydroxylamin
NICI	<i>negative ion chemical ionization</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOC7	[1-Hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-3-aminopropyl]-3-methyl-1-triazin
NOS	NO-Synthase
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3]quinoxalin-1-on
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OPA	<i>orto</i> -Phthaldialdehyd
PFB-	Pentafluorobenzyl-
PRP	plättchenreiches Plasma
RSD	relative Standardabweichung
R-SH	Sulphydryl-Gruppe, Thiol
RSNO	S-Nitroso-Substanz
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
sGC	lösliche Guanylat-Cyclase
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SIN-1	3-(4-Morpholiny)-sydnonimin
SNAC	S-Nitroso-N-acetylcystein
SNALB	S-Nitroso-Albumin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
SNC	S-Nitrosocystein
SNHb	S-Nitroso-Hämoglobin
SNHb[Fe ^{II}]	deoxy-Konformation des S-Nitroso-Hämoglobins
SNHb[Fe ^{II}]O ₂	oxy-Konformation des S-Nitroso-Hämoglobins
SNhC	S-Nitroso-Homocystein
SNP	Natriumnitroprussid
t _{1/2}	Halbwertszeit
UV-Vis	Ultraviolett-Visible
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v:v	Volumen zu Volumen

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtstag und -ort: 28.01.1971 in Hannover
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1977 - 1981 Grundschohle in Arnum
1981 - 1983 Orientierungsstufe der
Karl-Friedrich-Gauß-Schohle in Hemmingen
1983 - 1990 Karl-Friedrich-Gauß-Schohle in Hemmingen.
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07.1990 - 09.1991 Stationäre Altenpflege im DRK-Altenheim
Elkartallee, Hannover

Studium:

10.1991 - 01.1997 Studium der Chemie in Hannover
Wahlfach: Biochemie. Abschluß: Diplom

Promotion:

seit 03.1997 Arbeiten zur Dissertation in der Klinischen
Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover
bei Prof. Dr. J. C. Frölich in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Technische Chemie, Prof. Dr. T. Scheper

Hannover, den 08.05.2000

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Originalarbeiten

1. Tsikas, D., Sandmann, J., Ikic, M., Fauler, J., Stichtenoth, D.O., Frölich, J.C., Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine., *J. Chromatogr. B*, (1998), 708, 55-60.
2. Tsikas, D., Rossa, S., Sandmann, J., Frölich, J.C., High-performance liquid chromatographic analysis of nitrite and nitrate in human plasma as S-nitroso-N-acetylcysteine with ultraviolet absorbance detection., *J. Chromatogr. B*, (1999), 724, 199-201.
3. Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry., *Anal. Biochem.*, (1999), 270, 231-241.
4. Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. I. Preparation, purification, isolation, characterization and metabolism of S-[15N]nitrosoalbumin in human blood in vitro., *J. Chromatogr. B*, (1999), 726, 1-12.
5. Tsikas, D., Sandmann, J., Gutzki, F.M., Stichtenoth, D.O., Frölich, J.C., Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry. II. Quantitative determination of S-nitrosoalbumin in human plasma using S-[15N]nitrosoalbumin as internal standard., *J. Chromatogr. B*, (1999), 726, 13-24.
6. Tsikas, D., Sandmann, J., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Interference by S-nitroso compounds with the measurement of nitrate in methods requiring reduction of nitrate to nitrite by cadmium., *J. Chromatogr. B*, (1999), 729, 375-378.
7. Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F.M., Frölich, J.C., Gas chromatographic-mass spectrometric detection of S-nitroso-cysteine and S-nitroso-glutathione., *Anal. Biochem.*, (1999), 272, 117-122.
8. Tsikas, D., Sandmann, J., Holzberg, D., Pantazis, P., Raida, M., Frölich, J.C., Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde., *Anal. Biochem.* (1999), 273, 32-40.

Abstracts

1. Sandmann, J., Tsikas, D., Tewes, K.S., Frölich, J.C., Human red blood cells regulate metabolism and biological functions of S-nitroso compounds via a specific transport system for S-nitrosocysteine., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, (1999), 55, A17.
2. Tsikas, D., Ikic, M., Rossa, S., Sandmann, J., Tewes, K.S., Frölich, J.C., Inhibition of human blood platelet aggregation in vitro by S-nitrosocysteine and S-nitrosoalbumin via cGMP-dependent and cGMP-independent mechanisms., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, (1999), 55, A27.
3. Sandmann, J., Tsikas, Rossa, S., D., Tewes, K.S., Frölich, J.C., Regulation of transport, metabolism and biological functions of S-nitroso compounds in human erythrocytes by cysteine., *Amino Acids*, (1999), 17, (1999), 72.

Weitere Publikationen ohne direkten Bezug zu der vorliegenden Dissertation

1. Tsikas, D., Gutzki, F.M., Rossa, S., Bauer, H., Neumann, C., Dockendorff, K., Sandmann, J., Frölich, J.C., Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay - solutions by gas chromatography-mass spectrometry., *Anal. Biochem.*, (1997), 244, 208-220.
2. Schwedhelm, E., Sandmann, J., Tsikas, D., Synthesis of 3-nitro-L-[²H₃]tyrosine for use as an internal standard for quantification of 3-nitro-L-tyrosine by gas chromatography-mass spectrometrie., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, (1998), 41, 773-780.
3. Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., Dubiel, J.S., Frölich, J.C., Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (1999), 33, 652-658.
4. Surdacki, A., Nowicki, M., Sandmann, J., Tsikas, D., Kruszelnicka-Kwiatkowska, O., Kokot, F., Dubiel, J.S., Frölich, J.C., Effects of acute euglycemic hyperinsulinemia on urinary nitrite/nitrate excretion and plasma endothelin-1 levels in men with essential hypertension and normotensive controls., *Metabolism*, (1999), 48, 887-891.